อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การชักนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์สู่เซลล์ชนิด Interstitial cell ของลิ้นหัวใจ

Induction of human dental pulp stem cell to valvular interstitial cell

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนพ.สราวุธ คำปวน และคณะ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 21 ส.ค. 2558
เลขทะเบียน 1681992
เลขเรียกหนังสือ

QH
588
.S83
S451
2558

มกราคม 2558

สัญญาเลขที่ R2557B034

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การชักนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์สู่เซลล์ชนิด Interstitial cell ของลิ้นหัวใจ

Induction of human dental pulp stem cell to valvular interstitial cell

คณะผู้วิจัยและคณะ

1. ผศ.ดร.ทนพ.สราวุธ คำปวน คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ผศ.ดร.ทนพญ.อรัญญา จิระวิริยะกุล คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ทญ.ดร.บุณฑริกา ชื่นจิตกุลถาวร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
4. อ.ปฏิวัติ โชติมล คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2557

1 6879928

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือเป็นอย่างดีของผู้วิจัย และผู้ช่วยวิจัยและการให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีของหน่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนนเรศวร

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และนิสิตคณะทันตแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้ความรู้ และเก็บตัวอย่างฟันกรามที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณอาสาสมัคร ที่ให้ตัวอย่างฟันกรามที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ และคณะสหเวชศาสตร์ ที่สนับสนุนการใช้เครื่องมือ ครุภัณฑ์ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

สราวุธ คำปวน

ม.ค. 2558

บทคัดย่อ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน (Dental pulp cell : DPCs)สามารถแสดงคุณลักษณะการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) หรือที่เรียกว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน (Dental pulp stem cells : DPSCs) ซึ่งจัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดประเภท mesenchyme ที่มีคุณสมบัติเป็น multi-potential และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้โดยไม่มีข้อโต้แย้งทางด้านจริยธรรม งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นแยก DPCs จากโพรงประสาทฟันของฟันกรามซี่ที่ 3 จากอาสาสมัครที่ได้รับการถอนเพื่อการรักษา ตลอดจนทำการตรวจสอบโมเลกุลบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดบนผิวเซลล์โดยเทคนิคโฟลไซโตมิทรีโดยใช้ anti-human monoclonal antibody ต่อกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme ได้แก่ CD29, CD44, CD90, CD105 และ anti-human monoclonal antibody ต่อกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต ได้แก่ CD34, CD117 อีกทั้งได้ทำการเหนี่ยวนำ DPCs ให้มีพัฒนาการเป็นเซลล์กระดูกด้วยการย้อมสี alizarin red และทดสอบการพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันด้วยการย้อมสี oil red O สรุปผลการทดลองพบว่าผู้วิจัยสามารถแยกเซลล์โพรงประสาทฟันได้โดยมีการแสดงออกของโมเลกุลบ่งชี้การเป็นเซลล์ต้นกำเนิดบนผิวเซลล์ชนิด CD29, CD44, CD90 และ CD105 และมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์กลุ่ม hematopoietic stem cell ได้แก่ CD34 และ CD117 น้อย และเซลล์ที่ได้มีศักยภาพในการถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูกได้โดยสามารถตรวจการสะสมของแคลเซียมจากการย้อมสี alizarin red แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำ DPCs ให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันได้

คำสำคัญ : เซลล์ต้นกำเนิด; เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน; การแยกเซลล์; ตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด

ABSTRACT

In the several previous studies showed that cells in the pulp cavity (Dental pulp cell: DPCs) can contain stem cell characteristics or called dental pulp stem cells (DPSCs). The DPSCs is a mesenchymal stem cell, multi-potential properties and can be used for medical purposes without ethical arguments. This study aims to perform the DPCs isolation from human pulp tissue of a third molar. The stem cells characterization was determined mesenchymal stem cell surface markers (CD29, CD44, CD90, and CD105) and hematopoietic stem cell marker (CD34 and CD117) by flow cytometry. Then, the osteogenic and adipogenic differentiation ability of DPCs was measured by culturing cells in induction mediums. Osteogenic differentiation was measured by alizarin red staining and adipogenic differentiation was also measured by oil red o staining. The results showed that the isolated DPCs could highly express the mesenchymal stem cell surface markers (CD29, CD44, CD90 and CD105) and less expressed of the hematopoietic stem cell marker (CD34 and CD117). In addition, DPCs could be induced into osteogenic linage as the accumulation of calcium was observed by alizarin red staining. However, we could not successfully induce DPCs into adipogenic linage. In conclusion, the isolated DPCs could express mesenchymal stem cell characteristics and could be induced into osteogenic linage.

Keyword: Stem cell; Dental pulp stem cell; cell isolation; stem cell characterization

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ 1

บทคัดย่อ 2

ABSTRACT 3

สารบัญเรื่อง (Table of Contents) 4

บทที่ 1: บทนำ 5

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 5

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 8

2.1 เพื่อแยก เพาะเลี้ยง และตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme จากเซลล์โพรงประสาทฟันที่แยกได้จากฟันมนุษย์ 8

2.2 เพื่อศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน 8

3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 8

4 ทบทวนวรรณกรรม ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 8

บทที่ 2: วิธีดำเนินงานวิจัย และผลการวิจัย 26

2.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง 27

2.2 การแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน 27

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและการ subculture 28

2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน 30

2.5 การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาของเซลล์ 33

2.6 สถิติที่ใช้ในการวิจัย 34

บทที่ 3: ผลการทดลอง 35

บทที่ 4: วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 44

เอกสารอ้างอิง 47

บทที่ 1: บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เซลล์ต้นกำเนิด หรือ สเต็มเซลล์ (stem cells) คือเซลล์อ่อนที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ หรือเซลล์ที่ยังไม่มีการพัฒนาเพื่อไปทำหน้าที่อย่างเฉพาะเจาะจงซึ่งสามารถพบได้ทั่วร่างกายในอวัยวะต่างๆ เช่น ไขกระดูก ผิวหนัง ไขมัน โลหิต และ ฟัน เป็นต้น โดยเซลล์ต้นกำเนิด มีคุณสมบัติ 2 ประการ คือ สามารถเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเพื่อไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ได้อย่างแบ่งเซลล์ลักษณะเดิมทดแทนตัวเองได้ (self-renewal) (1) จากคุณสมบัติทั้ง 2 ประการของเซลล์ต้นกำเนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัด จึงสามารถนำเซลล์ต้นกำเนิดมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ภายในหลอดทดลอง และสามารถชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดนั้นเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะได้ด้วยกระบวนการทางห้องปฏิบัติการ ดังกล่าวนี้ เรียกว่า "Regenerative Medicine" (2) ซึ่งมีเป้าหมายในการใช้เซลล์ต้นกำเนิดในการซ่อมแซมจึงทำให้เกิดแนวคิดในการประยุกต์ใช้เซลล์ต้นกำเนิดมาเป็นแนวทางการรักษาโรค หรือ แก้ไขพยาธิสภาพบางประการ ภาวะพิการเรื้อรังและเสื่อมสภาพโดยการปลูกถ่ายเซลล์ใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเข้าไปในอวัยวะเหล่านั้นเพื่อให้ทำหน้าที่ทดแทนเซลล์เดิมที่เสื่อมสภาพไป หรือเกิดการบาดเจ็บ เสียหาย จากพยาธิสภาพต่างๆ ทำให้อวัยวะนั้น ๆ สามารถกลับมาทำงานต่อไปได้ ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมาก (3)

เซลล์ต้นกำเนิดสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 ชนิดตามแหล่งที่มา ได้แก่เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cells) และ เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย (adult stem cells) ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนนั้น เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพสูงมาก สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัดและสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกายได้เกือบทุกชนิด แต่อย่างไรก็ตามเนื่องด้วยข้อจำกัดหลายประการ

เช่น ปัญหาด้านปฏิกิริยาภูมิต้านทาน เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้เกิดจากการรวมตัวของไข่ และสเปิร์ม ทำให้เกิดความหลากหลายของ antigen (4) และปัญหาจริยธรรมที่เกิดขึ้นเนื่องจากการสกัดเซลล์จากตัวอ่อนมนุษย์มักจะใช้ตัวอ่อนที่มีอายุ 5-7 วันหลังปฏิสนธิ (เรียกว่า blastocyst) ซึ่งมีกลุ่มมวลเซลล์ภายใน (inner cell mass) ซึ่งการสกัดเซลล์นี้ออกมาคือ ตัวอ่อนนั้นถูกทำลายมิให้เจริญเติบโตต่อไปได้นั่นเอง ทำให้งานวิจัยโดยการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนหยุดชะงักลง (5) ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดอีกชนิดหนึ่ง คือเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีอยู่แล้วในร่างกายมนุษย์ สามารถแยกสกัดเซลล์ออกมาจากร่างกายได้ ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัยมีข้อดีกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนดังนี้คือ ไม่ก่อให้เกิดปัญหาเรื่องภูมิต้านทาน (5) เนื่องจากเป็นการใช้เซลล์ตัวเองไปเพาะเลี้ยงภายนอกให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นแล้วนำกลับเข้ามาสู่ร่างกาย มีความเสี่ยงในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์มะเร็งน้อยกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน และไม่มีปัญหาจริยธรรม (6) ปัจจุบันการพัฒนาทางการแพทย์มีการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัยมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะส่วนที่ได้จากไขกระดูก และสายสะดือเด็กหลังคลอด ซึ่งสามารถนำมารักษาโรคต่างๆ อาทิ มะเร็งเม็ดเลือด หลอดเลือดหัวใจตีบ เบาหวาน ธาลัสซีเมีย เป็นต้น (7, 8) โดยเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สามารถพบได้ในหลายอวัยวะ เช่น ไขกระดูก ผิวหนัง ไขมัน เป็นต้น (9) แต่การแยกสกัดเซลล์ต้นกำเนิดจากอวัยวะเหล่านี้จำเป็นต้องใช้เทคนิควิธีที่มีการรุกราน เช่น อาจต้องมีการเจาะไขสันหลังหรือมีการผ่าตัด ซึ่งอาจทำให้เกิดการบาดเจ็บ และเป็นอันตรายได้ นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสามารถพบเซลล์ต้นกำเนิดได้ที่ฟันด้วยเช่นกัน โดยบริเวณที่พบเซลล์ต้นกำเนิดในฟัน สามารถพบได้ทั้งในเนื้อเยื่อในโพรงฟัน และเนื้อเยื่อปริทันต์ (10) ซึ่งการแยกสกัดเซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน สามารถทำได้โดยเก็บจากฟันที่จำเป็นต้องได้รับการถอนเพื่อการรักษา โดย

เซลล์ต้นกำเนิดที่คณะผู้วิจัย มีความสนใจในการศึกษา คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (11)

เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน (Dental pulp stem cells : DPSCs) จัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดประเภท mesenchymal cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น multi-potential สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆได้หลายชนิด(12) และสามารถเพาะเลี้ยงและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม (13) และที่สำคัญที่สุดคือเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถนำมาใช้กับตนเองได้โดยไม่มีข้อโต้แย้งทางด้านจริยธรรม ซึ่งสามารถแยกได้จากฟันทุกซี่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟันกรามซี่ที่ 3 (third molar) (14) ซึ่งเป็นฟันกรามซี่สุดท้ายที่อยู่ด้านในสุดของขากรรไกรทั้งสี่ด้าน โดยปกติมักจะขึ้นในวัยผู้ใหญ่ ซึ่งหากฟันกรามซี่ที่ 3 ไม่สามารถขึ้นผ่านขอบเหงือกได้ จะถูกเรียกว่าฟันคุด (Impacted tooth/Wisdom tooth) ซึ่งมักทำให้เกิดการอักเสบและมีอาการปวดฟัน และจำเป็นที่ต้องได้รับการถอน หรือผ่าตัดออก เพื่อลดอาการอักเสบและอาการปวดฟัน ดังนั้น ฟันกรามซี่ที่ 3 นี้จึงเป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อฟันที่สามารถนำมาใช้ในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันซึ่งพบว่าในส่วนของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันของฟันกรามซี่ที่ 3 เป็นแหล่งของ Dental pulp stem cells (DPSCs) แหล่งหนึ่งที่มีเซลล์ต้นกำเนิดอยู่เป็นจำนวนมาก จากข้อเด่นของ DPSCs ที่มาจากโพรงประสาทฟันกรามซี่ที่ 3 ดังที่กล่าวมาแล้ว งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นแยก DPSCs จากโพรงประสาทฟันของฟันกรามซี่ที่ 3 ที่ได้รับการถอนเพื่อการรักษา ตลอดจนทำการตรวจสอบคุณสมบัติของ DPSCs **โดยวิธีโฟลไซโตมิทรี และการเหนี่ยวนำ DPSCs ให้กลายไปเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำ DPSCs ไปใช้ในการวิจัยเพื่อแก้ไขพยาธิสภาพหรือรักษาโรคต่อไป (15)**

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1เพื่อแยก เพาะเลี้ยง และตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme จากเซลล์โพรงประสาทฟันที่แยกได้จากฟันมนุษย์

2.2เพื่อศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน

3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการแยกเซลล์โพรงประสาทฟันของมนุษย์ ตรวจสอบคุณสมบัติ ศึกษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนคุณสมบัติไปทำหน้าที่เฉพาะอย่างของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน โดยทดสอบการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (osteocyte) และเซลล์ไขมัน (adipose cell) โดยเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน แยกจากฟันของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยให้ถอน โดยทันตแพทย์ โดยฟันที่ถอนต้องผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และต้องได้รับการยินยอมให้ใช้ประโยชน์จากชิ้นเนื้อดังกล่าวจากอาสาสมัครผู้บริจาคฟันอย่างเป็นลายลักษณ์อักษร โดยงานวิจัยนี้มีกรอบแนวคิดเพื่อตอบคำถามวิจัยคือ ศึกษาเซลล์โพรงประสาทฟันที่แยกได้จากฟันกรามซี่ที่ 3 ของมนุษย์ ว่ามีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดหรือไม่ และสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆได้หรือไม่

4 ทบทวนวรรณกรรม ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สเต็มเซลล์หรือเซลล์ต้นกำเนิดคือ เซลล์อ่อนที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ ซึ่งสามารถจัดหาหรือสร้างได้จากเซลล์ในหลายอวัยวะของร่างกาย (3, 7) เซลล์ต้นกำเนิด มี 2 คุณสมบัติสำคัญ คือ เป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวเองออกมาได้โดยที่ยังไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ หรือสามารถ

แบ่งเซลล์ ลักษณะเดิมทดแทนตัวเองได้(self-renewal) และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงได้ (differentiation potential) (16)

เซลล์ต้นกำเนิดจำแนกได้เป็น 4 ชนิดตามพัฒนาการหรือศักยภาพ (Potency)(17, 18) ประกอบด้วย

- Totipotent stem cells เป็นเซลล์ต้นกำเนิดในระยะแรกสุดมีศักยภาพที่จะสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์จำเพาะได้อย่างไม่จำกัดชนิด ทั้งเจริญไปเป็นตัวอ่อนทั้งตัว (embryonic tissue) และเนื้อเยื่อรอบนอกตัวอ่อน (extra-embryonic tissue) เซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพนี้สามารถพบได้ในเซลล์ตัวอ่อนของมนุษย์ระยะ zygote ก่อนถึงระยะ blastocyst
- Pluripotent stem cells เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่พบในระยะต่อมาจาก Totipotent stem cells มีความสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในอวัยวะต่างๆของร่างกายได้เกือบทุกชนิด ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพนี้ ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cells) ซึ่งเจริญมาจากเซลล์ส่วน inner cell mass ของตัวอ่อนระยะ blastocyst และเซลล์ต้นกำเนิดที่มาจากลูกอ่อน หรือ ทารกในครรภ์ (fetal stem cells) (18)
- Multipotent stem cells เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีความสามารถที่จำกัดกว่าเมื่อเทียบกับ Pluripotent stem cells เนื่องจากไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ทุกชนิดของร่างกายได้ **เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในเนื้อเยื่อเฉพาะอย่าง หรือ อวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง หรือ ระบบใดระบบหนึ่ง ที่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ภายในระบบนั้นได้หลากหลายชนิด เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (hematopoietic stem cells) ที่สามารถ**

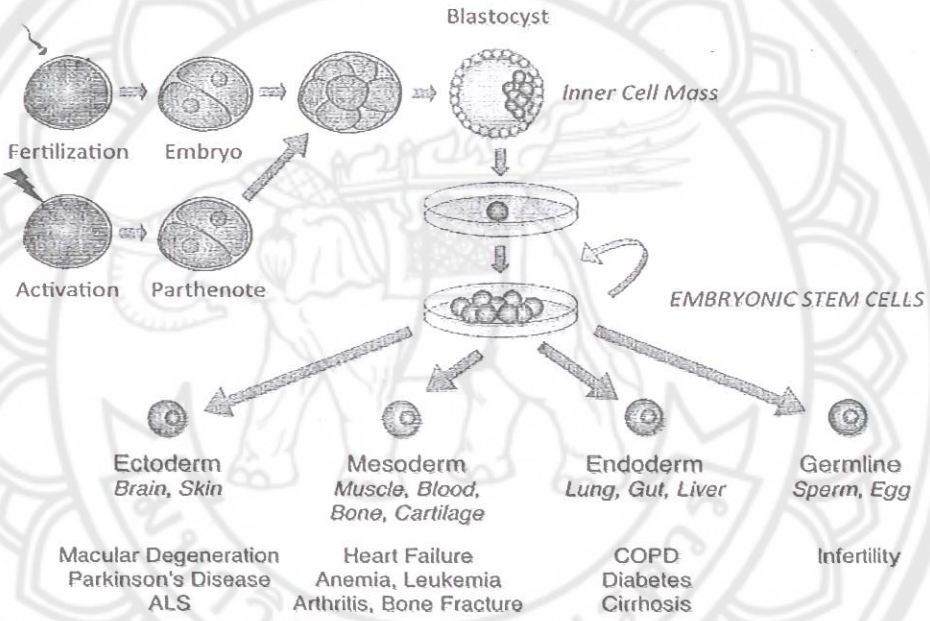
เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดได้ทุกชนิดได้แก่ red blood cells, lymphocytes, neutrophils, basophils, eosinophils, monocytes, macrophages, platelets (18)

- Unipotent stem cells คือ เซลล์ที่พัฒนาต่อมาจากเซลล์ต้นกำเนิดข้างต้น สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะได้เพียงอย่างเดียวเท่านั้น โดยสามารถพบได้ตามอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย เช่น spermatogonia stem cell ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นอสุจิได้เท่านั้น (19)

เซลล์ต้นกำเนิดแบ่งได้ 3 ประเภทตามแหล่งที่มา (source) ประกอบด้วย Embryonic stem cell (ES cell), Somatic/Adult stem cell (SS cell) และ Inducible pluripotent stem cell (iPS cell) (19, 20) .

- Embryonic stem cell (ES cell) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเซลล์ของตัวอ่อนในระยะ blastocyst (21) หลังการปฏิสนธิ 5-7 วัน โดย ES cell สามารถพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ แบ่งเป็น 3 ชั้น คือ endoderm คือ เนื้อเยื่อที่อยู่ชั้นในสุด ซึ่งชั้นนี้จะเจริญต่อไปเป็นเยื่อบุลำไส้ เยื่อบุทางเดินของระบบหายใจ กระเพาะปัสสาวะ ท่อปัสสาวะ ต่อมไทรอยด์ ตับ, mesoderm คือ เนื้อเยื่อที่อยู่ชั้นกลาง ซึ่งชั้นนี้จะเจริญต่อไปเป็นกล้ามเนื้อ กระดูก เส้นเลือด กระดูกอ่อน แก่นกลางของฟัน ไต ท่อไต รังไข่ (เพศหญิง) ลูกอัณฑะ (เพศชาย) หัวใจ หลอดโลหิต เยื่อหุ้มปอด และเยื่อหุ้มหัวใจ และ ectoderm คือ เนื้อเยื่อที่อยู่ชั้นนอกสุด เนื้อเยื่อชั้นนี้จะเจริญต่อไปเป็น ผิวหนัง ผม ขน เล็บ ต่อมน้ำลาย ต่อมน้ำมูก เคลือบฟัน ระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร และเนื้อเยื่อสมอง โดยตัวอ่อนระยะ blastocyst (21) นี้ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดคือ เซลล์ trophoblast และเซลล์ inner cell mass ซึ่งเซลล์ inner cell mass นั้นมีคุณสมบัติแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ดี (proliferation) และเป็น

เซลล์ที่มีความสามารถเป็น pluripotent stem cell (ภาพที่ 1) ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้หลายประเภทในร่างกายและเป็นอุดมคติสำหรับการรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิด (21) อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของ ES cell คือจริยธรรมในมนุษย์และสามารถทำให้เกิดก้อนเนื้องอก (teratoma) (22)

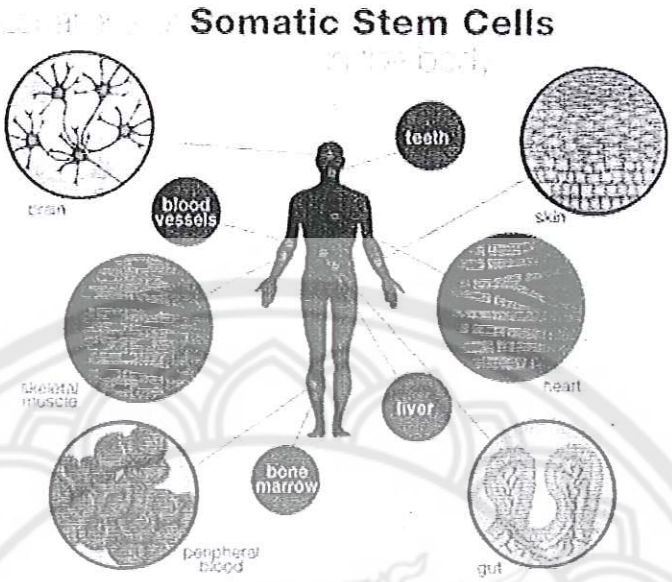


ภาพที่ 1 แสดง ES cell ซึ่งแยกมาจาก inner cell mass ของ blastocyst ซึ่งมีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะต่างๆในร่างกายได้เกือบทุกชนิด (23)

- Inducible pluripotent stem cell (iPS cell) คือการนำเซลล์ต้นตอจากเซลล์ที่เจริญวัยเต็มที่แล้วมาเปลี่ยน (reprogrammed) โดยการสอดแทรกยีน Oct 4 , Sox 2, Klf4, และ c-Myc เข้าไปใน viral vector และทำให้เซลล์ที่มีชิ้นยีนนี้เข้าไปมีการแสดงออกของคุณสมบัติการเป็น pluripotent (24) เนื่องจาก Klf4 และ c-Myc จัดเป็นยีนก่อมะเร็ง (oncogene) (24) จึง

เป็นที่กังวลถึงผลที่จะตามมาหากนำมาใช้ในการรักษาโรค แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาเป็นที่แน่ชัดจากความเสี่ยงของ oncogene ดังกล่าว

- Somatic/Adult stem cell (SS cell) หรือ เซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัย เป็น multipotent mesenchymal stem cell ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นในระยะแคบๆของร่างกายได้ (25) SS cell ถูกพบได้จากหลายๆอวัยวะ เช่น สมอง เนื้อเยื่อสะสมไขมัน (adipose tissue) กล้ามเนื้อ ฟัน และไขกระดูก (25, 26) (ภาพที่ 2) มักมีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดเล็ก บางเรียวยาว และอยู่อย่างกระจัดกระจาย มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ข้อดีของ SS cell คือ สามารถเก็บรักษาได้ง่ายและสามารถปลูกถ่ายเนื้อเยื่อให้กับตนเองได้ (autologous transplantation) (27) แต่การแยกสกัดเซลล์ต้นกำเนิดจากอวัยวะเหล่านี้จำเป็นต้องใช้เทคนิควิธีที่มีการรุกรานเพื่อการเจาะเก็บหรือการผ่าตัด ซึ่งอาจทำให้เกิดการบาดเจ็บ และเป็นอันตรายได้ นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสามารถพบเซลล์ต้นกำเนิดได้ที่ฟันด้วยเช่นกัน โดยบริเวณที่พบเซลล์ต้นกำเนิดในฟัน สามารถพบได้ทั้งในเนื้อเยื่อในโพรงฟัน และเนื้อเยื่อปริทันต์ (25) ซึ่งการแยกสกัดเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันสามารถทำได้โดยง่าย โดยเก็บจากฟันที่จำเป็นต้องได้รับการถอนเพื่อการรักษา โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่คณะผู้วิจัย มีความสนใจในการศึกษา คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (11)

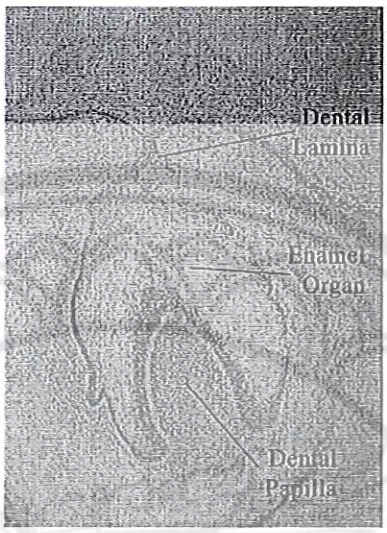


ภาพที่ 2 แสดงบริเวณที่สามารถพบ SS cell ได้ (28)

การเจริญและการเติบโตของฟัน (Development and growth of tooth) (29)

การสร้างฟันเริ่มมาจากอวัยวะเริ่มแรกของการสร้างฟัน คือ หน่อฟัน (tooth bud) ซึ่งเจริญมาจากแถบเยื่อบุผิวต้นกำเนิดฟัน (dental lamina) ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน (ภาพที่ 3) คือ

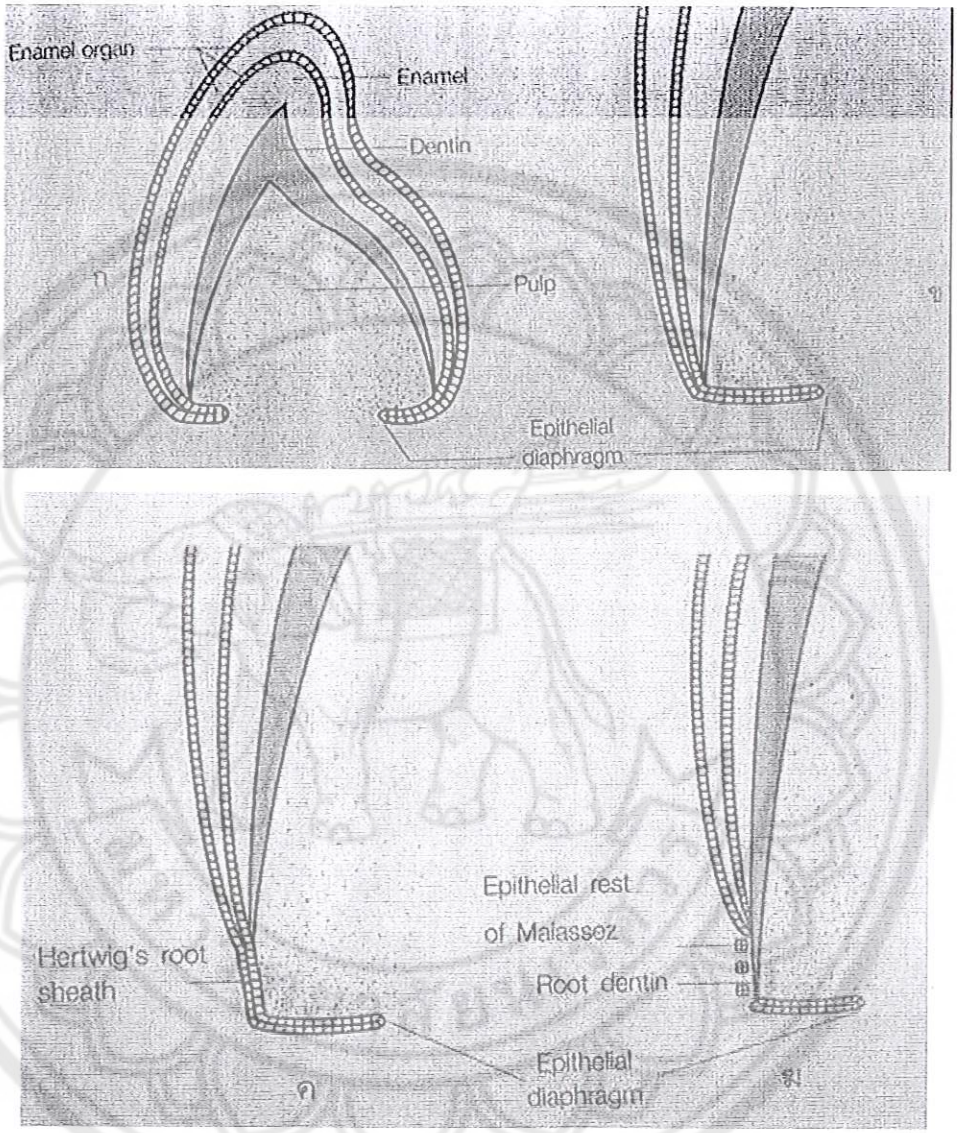
- อวัยวะสร้างฟัน (enamel organ) คือส่วนที่เจริญมาจาก ectoderm ทำหน้าที่สร้างเคลือบฟัน (enamel) และช่วยในการสร้างรากฟัน (root)
- ปุ่มเนื้อกำเนิดฟัน (dental papilla) คือส่วนที่เจริญมาจาก ectomesenchyme ทำหน้าที่สร้างเนื้อฟัน (dentin) และเนื้อเยื่อโพรงประสาท (pulp)
- ถุงหุ้มหน่อฟัน (dental follicle) คือส่วนที่เจริญมาจาก ectomesenchyme ทำหน้าที่สร้างเคลือบรากฟัน (cementum) เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone)



ภาพที่ 3 หน่อฟัน (tooth bud) และองค์ประกอบที่สำคัญของหน่อฟัน (30)

เมื่อหน่อฟันมีการเจริญเติบโตเต็มที่จะอยู่ในระยะรูปคล้ายตุ่มหรือหน่อ (bud stage) ส่งผลต่อการสร้างฟัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ การสร้างตัวฟัน (crown formation) และการสร้างรากฟัน (root formation) โดยการสร้างตัวฟันจะเริ่มเกิดขึ้นที่ขอบด้านตัด (incisal edge) ของฟันหน้าหรือที่ยอดปุ่ม (cusp tip) ของฟันหลัง โดยอวัยวะสร้างฟันที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างเยื่อบุผิวเคลือบฟันส่วนนอก (outer enamel epithelium) และเยื่อบุผิวเคลือบฟันส่วนใน (inner enamel epithelium) ซึ่งเป็นหน่อฟันในระยะรูปคล้ายหมวก (cap stage) โดยเซลล์เยื่อบุผิวเคลือบฟันส่วนในจะชักนำให้เซลล์รอบนอกของปุ่มเนื้อกำเนิดฟันให้เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) หลังจากเนื้อฟันสร้างขึ้นแล้ว เนื้อฟันจะชักนำให้เซลล์ของเยื่อบุผิวเคลือบฟันส่วนในเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเคลือบฟัน (ameloblast) แล้วผลิตแมทริกซ์เคลือบฟัน (enamel matrix) ต่อมาแคลเซียมสะสมในแมทริกซ์จนกระทั่งเป็นเคลือบฟันที่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นหน่อฟันในระยะรูปคล้ายกระดิ่งหรือระฆัง (bell stage) หลังจากนั้นอวัยวะสร้างฟันจะหยุดทำงานและฝ่อลีบไป เมื่อมีการสร้างตัวฟันเสร็จแล้ว จะมีการสร้างรากฟันต่อไปดังภาพที่ 4 โดยการสร้างรากฟันจะ

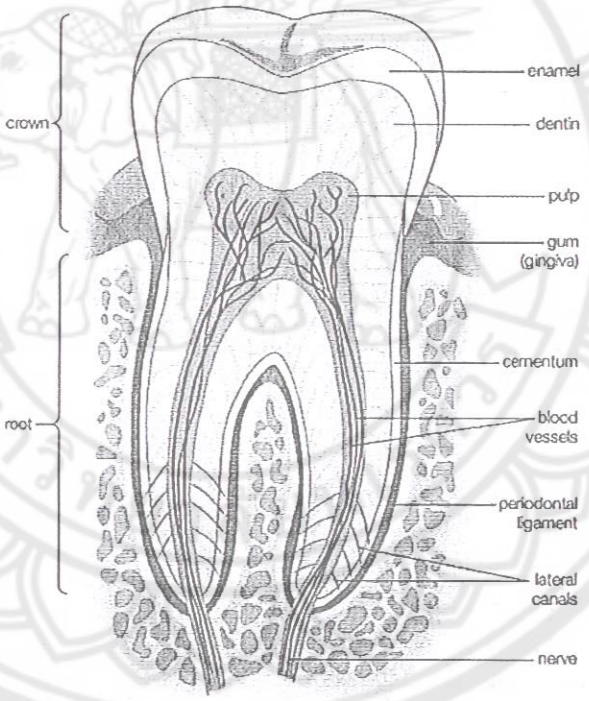
เกิดขึ้นบริเวณส่วนคอของอวัยวะสร้างฟันที่เป็นบริเวณที่เยื่อบุผิวเคลือบฟันส่วนนอกและส่วนในบรรจบกัน (cervical loop) เซลล์บริเวณนี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน งอกยาวออกและงออยู่ในแนวนอน กลายเป็นแผ่นแผ่ไปหุ้มปุ่มเนื้อกำเนิดฟัน ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ 2 ชั้นและมีรูตรงกลาง เรียกว่า เยื่อบุหุ้มรากเฮิร์ตวิก (Hertwig's epithelial root sheath) รูตรงกลางจะเจริญไปเป็นรูเปิดปลายรากฟัน (apical foramen) ขอบของรูเรียกว่า epithelial diaphragm เซลล์ในบริเวณดังกล่าวยังคงแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทำให้เยื่อบุหุ้มรากเฮิร์ตวิกยาวขึ้น และมีลักษณะเป็นปลอกห่อหุ้มปุ่มเนื้อกำเนิดฟันในส่วนราก เซลล์ชั้นในของเยื่อบุหุ้มรากจะชักนำให้เซลล์รอบนอกของปุ่มเนื้อกำเนิดฟันในส่วนรากเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) แล้วจะสร้างเนื้อฟันในส่วนราก เมื่อเนื้อฟันสร้างแล้วเยื่อบุหุ้มรากเฮิร์ตวิกจะเสื่อมสลายแล้วขาดและแตกแยกจากกันกลายเป็นเศษเยื่อบุผิวมาเลเซ (epithelial rest of Malassez) ซึ่งเป็นร่างแหหรือตาข่ายของเยื่อบุผิว ต่อมาเยื่อบุผิวเคลื่อนห่างออกจากผิวเนื้อฟัน เซลล์ของถุงหุ้มหน่อฟันจะเคลื่อนที่เข้าไปสัมผัสกับผิวของเนื้อฟันในส่วนรากและจะเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementum) แล้วจะสร้างเคลือบรากฟันห่อหุ้มเนื้อฟันในส่วนราก การสร้างรากฟันจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์



ภาพที่ 4 แสดงการสร้างรากฟัน (Root formation) โดยเริ่มจากการสร้างตัวฟันก่อน (ก และ ข) แล้ว จึงมีการสร้างรากฟันเกิดขึ้น (ค และ ง) (29)

โครงสร้างและองค์ประกอบของฟัน (Tooth anatomy)

ฟันถูกสร้างขึ้นมาจากเนื้อเยื่อ 4 ชนิด คือ เคลือบฟัน (enamel) เนื้อฟัน (dentin) เคลือบรากฟัน (cementum) และโพรงประสาทฟัน (pulp) โครงสร้างของฟันจะแข็งแรงขึ้นเมื่อเซลล์เริ่มมีการสะสมของแร่ธาตุโดยเฉพาะ แคลเซียม เมื่อถอนฟันออกมาจะสามารถมองเห็นเนื้อเยื่อได้ 2 ชนิด คือ เคลือบฟัน (enamel) และ เคลือบรากฟัน (cementum) ส่วนเนื้อเยื่ออีก 2 ชนิดไม่สามารถมองเห็นได้ คือ เนื้อฟัน (dentin) และ โพรงประสาทฟัน (pulp) เนื่องจากอยู่ภายใน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของฟันเพื่อแสดงองค์ประกอบของฟัน(31)

- **เคลือบฟัน (enamel) มีสีขาว ลักษณะแข็ง ทำหน้าที่ป้องกันส่วนนอกของฟัน ซึ่งบริเวณนี้มีการสะสมของแคลเซียมและแร่ธาตุเป็นจำนวนมาก (32)**

- Nutritive: เป็นบริเวณที่มีระบบเลือดมาคอยส่งสารอาหารเข้าสู่เนื้อเยื่อของฟัน
- Defensive or protective: โพรงประสาทรากฟันตอบสนองต่อการบาดเจ็บ หรือการผุของฟันโดยการซ่อมแซมเนื้อฟัน (โดยเซลล์ odontoblast)
- Major source of stem cell: เป็นแหล่งสำคัญที่มีเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน (Dental pulp stem cell) (33-35)

เซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน (Dental stem cell)

เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันสามารถพบได้หลากหลายบริเวณ แต่ปัจจุบันเซลล์ต้นกำเนิดที่พบได้ในหลายๆการศึกษา ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อยึดปริทันต์ (periodontal ligament stem cell, PDL) เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนม (stem cells from exfoliated deciduous teeth, SHED) และเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน (dental pulp stem cell, DPSCs)

- เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อยึดปริทันต์ (Periodontal ligament stem cell, PDL) (36)

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อยึดปริทันต์จัดอยู่ในประเภท SS cell ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal ถูกแยกได้ครั้งแรกในปี 2004 โดย Seo และคณะ ซึ่งแยกได้จากเนื้อเยื่อยึดปริทันต์ โดยพบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์ไขมัน และเซลล์กระดูกอ่อนได้ภายในหลอดทดลองเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

- เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนม (stem cells from exfoliated deciduous teeth, SHED) (37)

ในปี 2003 Dr.Songtao Shi ทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญในการรักษาฟันเด็กที่ National Institute of Health, Bethesda, Maryland, ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ค้นพบ stem cells หรือเซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณสมบัติพิเศษจากฟันน้ำนม ซึ่งฟันน้ำนมจะเกิดขึ้นเมื่อเด็กอายุประมาณ 6 เดือน และจะเริ่มหลุด

ในช่วงอายุประมาณ 5-12 ปี Dr.Shi สามารถเปลี่ยนแปลงไปเซลล์กระดูก เซลล์ไขมัน และเซลล์กระดูกอ่อนได้ เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนม ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษดีกว่า adult stem cells ที่เก็บได้จากแหล่งอื่น ๆ ของร่างกาย สามารถที่จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและมีคุณสมบัติสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่าง ๆ ได้หลายชนิด (multi-potential differentiation) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

- เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน (Dental pulp stem cells, DPSCs)

เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันจัดอยู่ในประเภท SS cell ซึ่งเป็นเนื้อเยื่ออ่อนของ ectomesenchymal origin เซลล์โพรงประสาทรากฟันพัฒนามาจาก dental papilla(38) ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันพบได้หลากหลายบริเวณ DPSCs แยกได้ครั้งแรกในปี 2000 โดย Gronthos และคณะ ซึ่งได้แยกเซลล์ออกมาจากโพรงประสาทฟันกรามซี่ที่สามของมนุษย์ แล้วนำมาเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ที่ได้กับเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme จากไขกระดูกพบว่ามีลักษณะเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และเมื่อนำมาปลูกถ่ายในหนูที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องพบว่าสามารถเปลี่ยนรูปร่างไปเป็น dentin/pulp-like complex ได้ (34) ซึ่งในปัจจุบัน DPSCs ถูกนำมาใช้ทางคลินิกมากเมื่อเทียบกับ SS cell จากแหล่งอื่น เช่น สมอง เนื้อเยื่อไขมัน กล้ามเนื้อ และไขกระดูก เพราะสามารถแยกออกมาได้ง่ายจากฟันกรามซี่ที่ 3 ซึ่งทำให้มีอัตราเสี่ยงน้อย และมีปัญหาทางจริยธรรมน้อย (39) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า DPSCs สามารถเก็บรักษาสภาพได้อย่างน้อย 6 สัปดาห์หลังจากแยกออกมาจากโพรงประสาทฟัน และยังคงคุณสมบัติในการพัฒนาไปเป็นเซลล์อื่นๆ (40) และยังพบว่า DPSCs มีคุณสมบัติเป็น mesenchymal stem cell ทั้งภายนอกและภายในร่างกายของสัตว์ทดลอง (41, 42) จึงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่เหมาะสมในการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน (Dental pulp stem cells, DPSCs)

DPSCs เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่จัดอยู่ในประเภท SS cell ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme มีต้นกำเนิดจาก neural crest (43) มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ self-renewal และ differentiation potential (16) DPSCs สามารถพัฒนาไปเป็น เซลล์กระดูก (osteoblast) เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) และเซลล์ไขมัน (adipose cell) ได้ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติประการหนึ่งสำหรับใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme (34, 44) และนอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ประสาท (neurocyte) และเซลล์กล้ามเนื้อ (myocyte)ได้ (45, 46) จากการศึกษาพบว่า DPSCs มีลักษณะรูปร่างแบบกระสวย (spindle shape) คล้ายกับเซลล์ fibroblast (46) และสามารถเก็บได้ที่ -85o C หรือ -196o C ได้อย่างน้อย 6 เดือนโดยไม่สูญเสียความสามารถการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (47) แต่อย่างไรก็ตาม DPSCs ไม่มีโมเลกุลบ่งชี้บนผิวเซลล์ที่จำเพาะ แต่สามารถแสดงลักษณะบ่งชี้ของ mesenchymal cell ได้แก่ CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106/VCAM-1, CD146, CD166 และ Stro1 (48) และจะมีการแสดงออกเพียงเล็กน้อยของ CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133 และ HLA-DR(34, 47, 49-51) นอกจากนั้น DPSCs ยังมีการแสดงออกของ Oct4, Sox2, Ssea4, Nanog และ Lin28 เหมือนใน ES cell อีกด้วย (48, 50) ซึ่งโมเลกุลบ่งชี้บนผิวเซลล์เหล่านี้สามารถใช้ในการเลือก DPSCs หลังจากแยกออกมาจากเซลล์โพรงประสาทฟัน เพื่อใช้ในการยืนยันศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นต่อไป

บทบาทในการปฏิรูปการรักษาจากเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน

ในช่วงระยะเวลา 10 ปีมานี้ มีการปฏิรูปการรักษาโดยใช้ DPSCs ซึ่งเข้ามามีบทบาทในการรักษาในหลายโรค และมีบทบาทสำคัญในหลายงานวิจัย ซึ่งความสามารถในการซ่อมแซมและการสร้างใหม่ของ DPSCs ในหลายๆโรคถูกกล่าวถึงอย่างกว้างขวาง ได้แก่

- ผลของการใช้ DPSCs ในโรคเบาหวาน

มีการรายงานเกี่ยวกับการใช้ DPSCs เหนี่ยวนำให้เป็น β-cells ของตับอ่อนในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่า DPSCs ที่ถูกเหนี่ยวนำสามารถหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (52, 53) โดย E.T. Guimarase และคณะ รายงานว่าได้ทำการฉีด DPSCs เข้าไปในหนูถีบจักรที่ได้รับสาร Streptozotocin (STZ) ซึ่งมีความเป็นพิษอย่างจำเพาะต่อ β-cells ของตับอ่อน และชักนำให้เกิดเบาหวานชนิดที่ 1 จากผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ฉีด DPSCs มีการสร้าง β-cells ของตับอ่อนขึ้นมาทดแทน และมีการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีด DPSCs (54)

- ผลของการใช้ DPSCs ในโรคกล้ามเนื้อลีบ (55)

ในปี ค.ศ. 2008, Kerkis และคณะ ได้รายงานความสามารถของ human DPSCs ในการรักษาโรคกล้ามเนื้อลีบ โดยฉีด DPSCs เข้ากล้ามเนื้อของสุนัขที่เป็นโรคกล้ามเนื้อลีบ และติดตามผลเป็นระยะเวลา 2 ปี โดยผลการศึกษาพบว่าอาการของสุนัขที่เป็นกล้ามเนื้อลีบดีขึ้น โดยมีการเพิ่มขึ้นของเส้นใยกล้ามเนื้อ เป็นผลให้สุนัขมีการทรงตัวดีขึ้น และแข็งแรงมากขึ้น จึงเชื่อว่า DPSCs มีส่วนช่วยในการฟื้นฟูสภาพกล้ามเนื้อลีบ

- ผลของการใช้ DPSCs ในโรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย (56)

จากการศึกษาโดยปลูกถ่าย DPSCs ไปยังกล้ามเนื้อของหนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน ได้ผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า DPSCs สามารถช่วยฟื้นฟูการทำงานของ

หัวใจห้องล่างซ้ายให้ดีขึ้นจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย ยิ่งไปกว่านั้น การปลูกถ่าย DPSCs ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจด้านหน้าหนาตัวขึ้น เพิ่มการผลิตคอลลาเจน เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดขึ้นมาใหม่ และลดพื้นที่ของกล้ามเนื้อหัวใจตาย ทำให้การทำงานของหัวใจห้องล่างซ้ายทำงานได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม DPSCs ไม่ได้เปลี่ยนไปเป็นเซลล์หัวใจ หรือเซลล์หลอดเลือด แต่ผู้วิจัยคาดว่า DPSCs มีความสามารถในการสร้าง pro-angiogenic factors และ anti-apoptotic factors

- ผลของการใช้ DPSCs ในการฟื้นฟูความผิดปกติของดวงตา

ความสามารถของ DPSCs ในการรักษาโรคตา ได้ถูกคิดค้นโดย Gomes และคณะ ในปี ค.ศ. 2010 (57) โดยนำ DPSCs ที่ถูกแยกออกมา ไปปลูกถ่ายยังตาของกระต่ายที่เหนี่ยวนำให้ผิวกระจกตาเสื่อมโดยใช้ NaOH ผลการทดลองพบว่า การปลูกถ่าย DPSCs ช่วยให้กระจกตาของกระต่ายดีขึ้น คือ มีการสร้างเยื่อบุกระจกตาขึ้นมาใหม่ และมีการสร้างหลอดเลือดเข้ามาเลี้ยงเนื้อเยื่อบริเวณตามากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีด DPSCs (57) และเมื่อไม่นานมานี้ ในปี ค.ศ. 2013 Mead B. และคณะ ได้รายงานว่า DPSCs ที่แยกจากหนูแรทสามารถซ่อมแซมเส้นประสาทของตาที่บาดเจ็บโดยฉีด DPSCs เข้าไปในน้ำวุ้นตาของหนู (58) จึงทำให้เห็นว่า DPSCs มีความสามารถในการฟื้นฟูความผิดปกติของดวงตาได้

- ผลของการใช้ DPSCs ในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อปริทันต์

DPSCs เป็นที่นิยมในงานวิจัยทางทันตกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการฟื้นฟูเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยมีหลายรายงานที่แสดงความสามารถของ DPSCs ในการฟื้นฟูรากฟัน และฟื้นฟูเนื้อเยื่อปริทันต์ (51, 59) Sonoyama และคณะ ได้รายงานถึงการใช้ root apical papilla of human teeth (SCAP) ร่วมกับการใช้ periodontal ligament stem cells (PDLSCs) ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองชนิดนี้เป็น mesenchymal stem cell ที่คล้ายกับ DPSCs ที่พบได้ในฟันมนุษย์ นำมาขึ้นเป็นโครงรูปฟันโดยใช้เจ

ลโฟมเป็นโครงร่างยึดเหนี่ยว และมีการนำไปแทนที่ฟันใน miniature pigs (minipigs) ที่ถูกทำให้เกิดความเสียหายด้วย hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) พบว่าสามารถฟื้นฟูการทำงานของฟันที่เสียหายไปได้ (51)นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการปลูกถ่าย DPSCs ที่แยกออกมาจากฟันสุนัขสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเคลือบรากฟัน และเพิ่มความหนาแน่นของเอ็นยึดปริทันต์ในสุนัขที่เป็นโรคเหงือกอักเสบด้วย(59)

- ผลของการใช้ DPSCs ในการฟื้นฟูระบบประสาท (60)

นอกจาก DPSCs ของมนุษย์ที่มีความสามารถในการฟื้นฟูความเสียหายของอวัยวะดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว DPSCs จากสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น หนูถีบจักรและ ลิงรีซัสก็มีความสามารถในการฟื้นฟูความเสียหายของอวัยวะเช่นกัน มีรายงานเกี่ยวกับ ciliary neurotrophic factor หลังจากทำการปลูก DPSCs ของลิงรีซัสสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ประสาท และส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยปลูกถ่ายเซลล์ DPSCs ของลิงรีซัส เข้าไปในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูถีบจักรที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน พบว่าสามารถฟื้นฟูการทำงานของระบบประสาทได้

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า DPSCs มีความสามารถซ่อมแซมและฟื้นฟูอวัยวะต่างๆ ในร่างกายได้ทำให้ในปัจจุบันมีการนำ DPSCs มาใช้ในทางการแพทย์ในการสร้างเซลล์ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะเป้าหมาย มาใช้ทดแทนอวัยวะเดิมที่เสื่อมสภาพไป หรือเกิดการบาดเจ็บ เสียหาย จากพยาธิสภาพต่างๆ ทำให้อวัยวะนั้น ๆ สามารถกลับมาทำงานต่อไปได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคหัวใจซึ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญและมีอุบัติการณ์สูงขึ้นในปัจจุบัน ยกตัวอย่างเช่น โรคลิ้นหัวใจ (Valvular heart disease) โรคลิ้นหัวใจ นับเป็นโรคเรื้อรังที่มีความสำคัญ ถึงแม้ว่าจะไม่จัดเป็นโรคที่จัดเป็นสาเหตุการตายสูงสุดของประชากรทั่ว โลก แต่โรคลิ้นหัวใจ เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความ

ว QH
5ช9
.S93
ร951
ป55ช

1 6819928

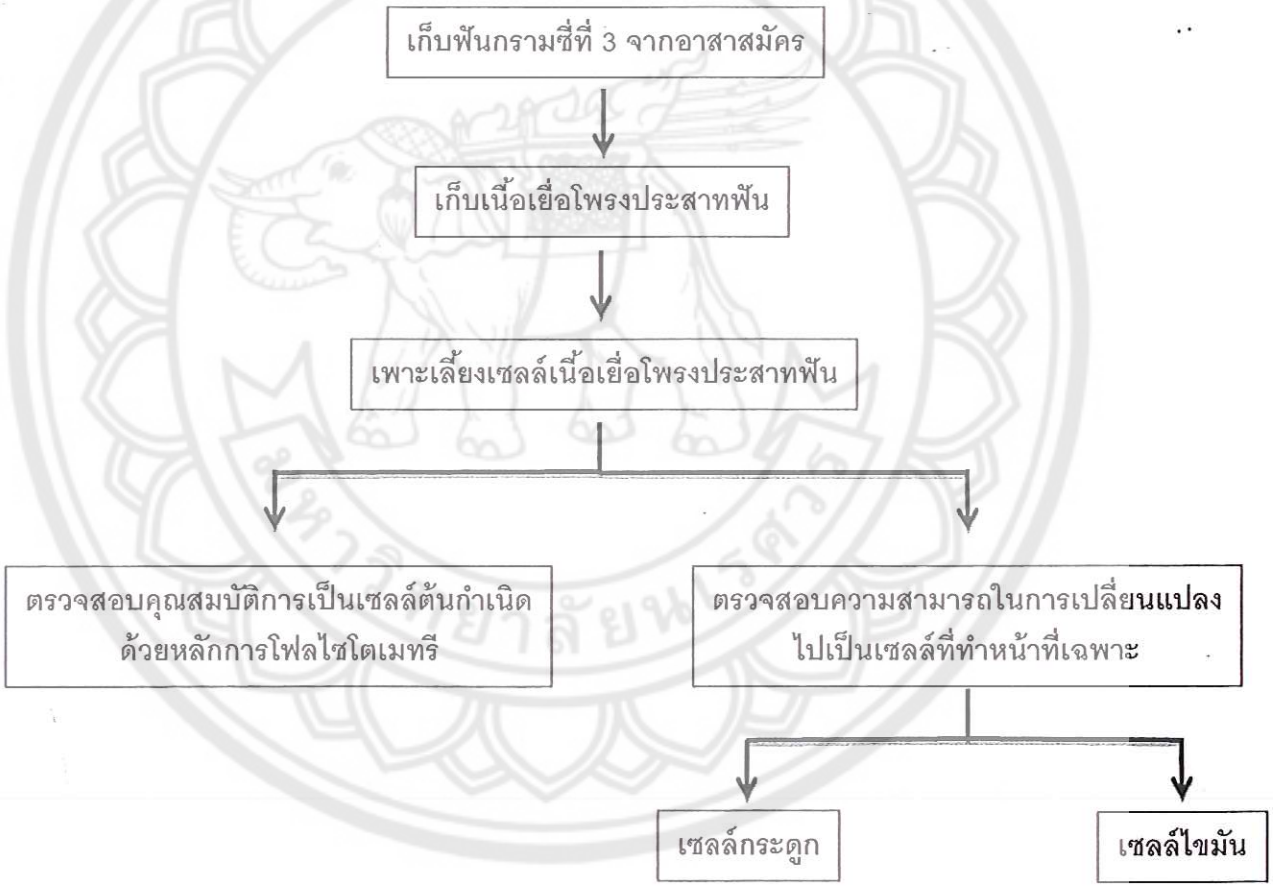
21 ส.ค. 2558

สำนักหอสมุด

ผิดปกติในการทำงานของหัวใจ และจำเป็นต้องได้รับการรักษา ซึ่งหากละเลยไม่ทำการรักษาอาจจะนำมาสู่อาการแทรกซ้อนและความผิดปกติอื่นๆตามมา และเป็นสาเหตุทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยแย่ลง ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัย "การชักนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์สู่เซลล์ชนิด interstitial cell ของลิ้นหัวใจ" ในส่วนต้นซึ่งจะทำการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme stem cell จากโพรงประสาทฟันมนุษย์ เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประโยชน์ ก่อนทำการชักนำไปเป็นเซลล์ชนิด interstitial cell ของลิ้นหัวใจ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการรักษาโรคลิ้นหัวใจในอนาคต

บทที่ 2: วิธีดำเนินงานวิจัย และผลการวิจัย

วิธีดำเนินงานวิจัยประกอบไปด้วย 3 ส่วนหลักคือ การแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์โพรงประสาทฟัน การตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดด้วยหลักการโฟลไซโตเมทรี และการตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนระเบียบวิธีวิจัย

2.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

อาสาสมัครผู้บริจาคฟันเป็นเพศชาย หรือ หญิงที่มีสุขภาพดี อายุไม่เกิน 30 ปี จำนวน 1 ราย โดยบริจาคฟันกรามที่ถอนแล้วโดยสมัครใจ ในกรณีที่อาสาสมัครอายุไม่บรรลุนิติภาวะ ต้องได้รับความยินยอมและอนุญาตจากผู้ปกครองก่อน โดยการถอนฟันต้องผ่านการวินิจฉัย และลงความเห็นจากทันตแพทย์ว่าให้ถอนเพื่อการรักษาโดยฟันต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้

1. เป็นฟันที่ไม่มีรอยโรคฟันผุลุกลามจนถึงเนื้อโพรงประสาทฟัน

2. ไม่มีภาวะโรคปริทันต์อักเสบบริเวณรอบตัวฟัน

3. ในขณะทำหัตถการถอนฟัน ไม่ควรใช้ความร้อนหรือมีการสัมผัสความร้อนจากหัวกรอที่ใช้แบ่งฟันในการนำฟันออกมา

อาสาสมัครผู้บริจาคชิ้นเนื้อส่วนฟันที่จะถอนจะได้รับการชี้แจง แนะนำอย่างละเอียด ก่อนการลงนามยินยอมมอบชิ้นเนื้อส่วนฟันที่ถอนอย่างเป็นลายลักษณ์อักษรและหากอาสาสมัครผู้มีความประสงค์จะไม่อนุญาตให้ทำการวิจัยกับชิ้นส่วนฟันที่ถอนนั้นในภายหลัง นักวิจัยต้องส่งคืนเนื้อชิ้นส่วนฟันที่ถอนพร้อมเอกสารการยินยอมคืนแก่อาสาสมัครผู้บริจาค

โครงงานนี้ใช้ชิ้นเนื้อฟันภายใต้โครงการวิจัย "การชักนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์สู่เซลล์ชนิด interstitial cell ของลิ้นหัวใจ" ที่ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมในมนุษย์ จากกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เลขที่ 55 01 04 0009 วันที่ 23 กรกฎาคม 2556

2.2 การแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน

ทำการเก็บตัวอย่างฟันกรามซี่ที่ 3 จากอาสาสมัครที่โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และขนส่งในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่แช่อยู่ในน้ำแข็งมาที่ห้องปฏิบัติการคณะสหเวชศาสตร์ นำชิ้นส่วนฟันที่ได้มาทำการล้างด้วยน้ำไร้ไอออน (DI water), sterile phosphate buffer saline (sterile PBS) และใส่ใน

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาต้านจุลชีพ (antibiotic) ตามลำดับ และใช้ใบมีดผ่าตัดขูดเนื้อเยื่อบริเวณรอบชิ้นฟันให้สะอาด แล้วนำชิ้นส่วนฟันที่ได้มาทำให้แตกโดยใช้ค้อนและสิ่ว วางบริเวณรากฟันที่แยกออกจากกัน จากนั้นทำการเก็บเนื้อเยื่อจากโพรงประสาทฟันโดยตลอดการเก็บเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันนั้นมีอาจารย์ทันตแพทย์เป็นผู้ควบคุม นำเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กละเอียด (<1mm3) ด้วยใบมีดผ่าตัด และนำชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันมาใส่ลงในเอนไซม์ collagenase type I ความเข้มข้น 2 mg/ml ปริมาตร 1 ml และนำไป rotator เป็นเวลา 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการปั่นตกเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันที่ความเร็วรอบ 1,800 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อ

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันและการ subculture

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (33, 61)

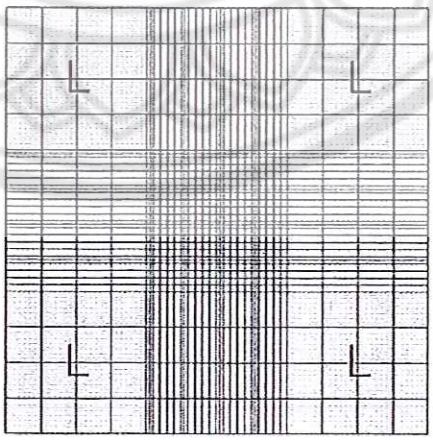
ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยการนำเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันที่ปั่นตกตะกอนได้ในข้อ 3.4 มาวางลงบนจานเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal bovine serum 15% และ penicillin 100 IU/ml streptomycin 100 µg/ml เป็นส่วนประกอบ เพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส 95% O2 และ 5% CO2 จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวออกมาอยู่รอบชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันจนมีปริมาณมากพอแล้ว นำชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันออก จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส 95% O2 และ 5% CO2 และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตความหนาแน่น (confluent) ได้ประมาณ 80-90% ของพื้นที่ผิว จึงทำการ subculture

2. การ subculture

นำเซลล์ที่มีความหนาแน่น (confluent) ได้ประมาณ 80-90% ของพื้นที่ผิวมาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม sterile PBS 1-2 ml เพื่อทำการล้างเซลล์แล้วดูด sterile PBS ออก ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเติม trypsin 1-2 ml นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO2 ประมาณ 2-5 นาที แล้วนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าเซลล์ได้หลุดจากพื้นผิวภาชนะ และทำการหยุดปฏิกิริยาของ trypsin โดยการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ fetal bovine serum ปริมาณเป็น 2 เท่าของปริมาตร trypsin แล้วถ่ายสารละลายทั้งหมดในจานเลี้ยงเซลล์ลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml หรือ 50 ml แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,800 รอบ/นาที นาน 10 นาที ทิ้งส่วนใส (supernatant) แล้วนำอาหารลงไป resuspend cell กำหนด dilution ของสารละลายเซลล์ แล้วจึงนำไปลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์อันใหม่

3. การนับจำนวนเซลล์

ทำการ subculture เซลล์ที่ต้องการนับจำนวนด้วยวิธีการดังข้อที่ 3.5.2 แล้วนำเซลล์มานับด้วย counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยจะนับ 4 ช่องของเม็ดเลือดขาว ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงบริเวณ counting chamber (บริเวณ L) ที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์ (62)

การคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์สามารถทำได้โดยการคำนวณจากสูตร

Cell number (cells/μl) =

(N คือ จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้)

หรือ Cell number (cells/ml) = cells per square x 104 x dilution factor

2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน

1 การตรวจสอบการแสดงออกของโมเลกุลบ่งชี้บนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค Flow cytometry (33, 35, 61)

ทำการตรวจสอบความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน โดยเทคนิค Flow cytometry โดยใช้ anti-human monoclonal antibody ต่อกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme ได้แก่ CD29, CD44, CD90, CD105 และ anti-human monoclonal antibody ต่อกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต ได้แก่ CD34, CD117 ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง Phycoerythrin (PE) หรือ Fluorescein Isothiocyanate (FITC) สำหรับขั้นตอนการย้อมเซลล์(61) มีวิธีการ คือ เพาะเลี้ยง DPCs ในอาหารเลี้ยงเซลล์จนถึงรุ่นที่ 3 (passage 3) จากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนเหลือประมาณ 2 ml แล้วใช้ cell scraper ทำการขูดเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวภาชนะและตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวภาชนะเรียบร้อยแล้วจะใช้ pipette ดูด-เป่าเซลล์ เพื่อไม่ให้เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม จากนั้นถ่ายเซลล์จากจานเลี้ยงเซลล์ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วนำเซลล์ไปปั่นที่ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส เติม PBS เพื่อ resuspend cell แล้วนำไปปั่นที่ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วเติม PBS 1 ml เพื่อ resuspend cell อีกครั้ง แล้วดูดสารละลายเซลล์ 20 μl ผสมกับ trypan blue 20 μl นำไปนับจำนวนเซลล์เพื่อดูปริมาณของเซลล์

ทั้งหมดและดูความมีชีวิตของเซลล์ โดยจะใช้เซลล์จำนวนไม่เกิน 1x106 cell มาทำปฏิกิริยา จากนั้นเติม PBS จนครบปริมาตรที่ต้องการ แล้วแบ่งเซลล์ใส่ microcentrifuge tube นำไปปั่นที่ 2500 รอบ/นาที นาน 3 นาที จนสังเกตเห็นตะกอนของเซลล์ (หากไม่เห็นตะกอนของเซลล์อาจทำการปั่นซ้ำ) ดูดส่วนใสทิ้ง ใส่แอนติบอดีที่จำเพาะปริมาตร 5 µl (undiluted, สำหรับ diluted แอนติบอดีทำได้โดยการผสมแอนติบอดีกับ FACS buffer) และบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที – 1 ชั่วโมง แล้วทำการล้างเซลล์ ด้วย FACS buffer แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2500 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอนมา resuspend cell ด้วย FACS buffer ถ่ายสารละลายที่ได้ใส่ FACS tube ทำการปั่นซ้ำอีก 1 ครั้ง ดูดส่วนใสทิ้ง เติม FACS buffer ปริมาตร 1 ml เพื่อ resuspend cell แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer ยี่ห้อ Beckman coulter รุ่น FC500-MCL เปรียบเทียบกับ Isotype control ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่เป็น immunoglobulin subtype เดียวกันและ conjugated ด้วยสีชนิดเดียวกัน

2 การทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ เมื่อได้รับการชักนำ (33, 61)

2.1 ทดสอบความสามารถในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์กระดูก

เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันใน 6-well plate เป็นเวลา 7, 14, 21, 28 วันในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ 50 mg/ml ascorbic 2-phosphate, 10nM dexamethasone และ 10 mM β glycerol phosphate เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด จึงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม และล้างทุกหลุม ด้วย PBS 1 ml 2 ครั้ง แล้วนำ PBS ที่ล้างครั้งสุดท้ายออกจนหมด จากนั้นเติม 10%

formalin 1 ml ในทุกหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลาย formalin ออกให้หมด แล้วล้างทุกหลุมด้วย DI H2O หรือ double distill H2O 2 ครั้ง เติม 500 ul 40 mM alizarin red ลงในทุกหลุม ตั้งเพลททิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที พร้อมทั้งทำการเขย่าเบาๆ จากนั้นทำการดูดสีย้อมออกและล้างทุกหลุม 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ด้วย DI H2O 1 ml (เขย่าบนเครื่อง shaker) เปลี่ยน DI H2O ทุกๆ 5 นาที ครั้งสุดท้ายเอียงเพลทแล้วดูดน้ำออกจนหมด ตรวจดูการติดสีของเซลล์ภายใต้กล้อง phase contrast microscope

2.2 ทดสอบความสามารถในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็น เซลล์ไขมัน

เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันใน 6-well plate เป็นเวลา 7, 14, 21, 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ 50 µg/ml ascorbic 3-phosphate, 100 nM dexamethasone และ 50 µg/ml indomethacine เมื่อครบเวลาที่กำหนด จึงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมและล้างทุกหลุมด้วย PBS 1 ml 2 ครั้ง แล้วนำ PBS ที่ล้างครั้งสุดท้ายออกจนหมด จากนั้นเติม 10% formalin 1 ml ในทุกหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลาย formalin ออกให้หมด ล้างทุกหลุมด้วย DI H2O หรือ double distill H2O 2 ครั้ง จึงเติม 60% isopropanol 2 ml ให้ท่วมในแต่ละหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที จากนั้นดูด 60% isopropanol ออกจนหมด แล้วจึงเติม 2 ml ของ working solution of oil red o ให้ท่วมในแต่ละหลุม หมุนเพลทเพื่อให้ oil red o กระจายทั่วทั้งหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาโดยล้างทุกหลุมที่ย้อม oil red o จนน้ำที่ล้างใส และต้องไม่ให้น้ำประปาไหลแรงเกินไปเพราะอาจจะทำให้เซลล์หลุดได้ ตรวจดูการติดสีของเซลล์ภายใต้กล้อง phase contrast microscope

2.5 การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาของเซลล์

1. การคำนวณระยะเวลาเพิ่มจำนวนประชากรของเซลล์เป็น 2 เท่า (Growth Curve/ Population Doubling Time; PDT)

Subculture cell ออกจากหลุมเพาะเลี้ยง จากนั้นทำการนับจำนวนของเซลล์ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 5 วัน นำจำนวนเซลล์จากชุดการทดลอง 3 ชุดที่ไม่ขึ้นต่อกัน (3 independent experiments) มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) แล้วนำค่านั้นมาทำการเขียนกราฟและคำนวณหาค่า PDT โดยสูตรดังนี้

$$Td = (t2 - t1) \times \frac{log(2)}{log(\frac{q2}{q1})}$$

เมื่อ Td = Doubling Time

q1 = ปริมาณเซลล์ ณ เวลาจุดที่ 1 (หน่วยเป็นชั่วโมง)

q2 = ปริมาณเซลล์ ณ เวลาจุดที่ 2 (หน่วยเป็นชั่วโมง)

t1 = เวลาเริ่มต้น (หน่วยเป็นชั่วโมง)

t2 = เวลาสิ้นสุด (หน่วยเป็นชั่วโมง)

2. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย MTT assay

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ทิ้งและเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ปริมาตร 500 µl จากนั้นเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้งแล้วเติม DMSO 700 µl แล้วทำการวัดการดูดกลืนแสงซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm นำค่า O.D. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ในกลุ่มการทดลองและระยะเวลา

ที่ใช้ในการเจริญเติบโต วิเคราะห์คำนวณค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยสถิติ unpaired t-test และหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.6 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

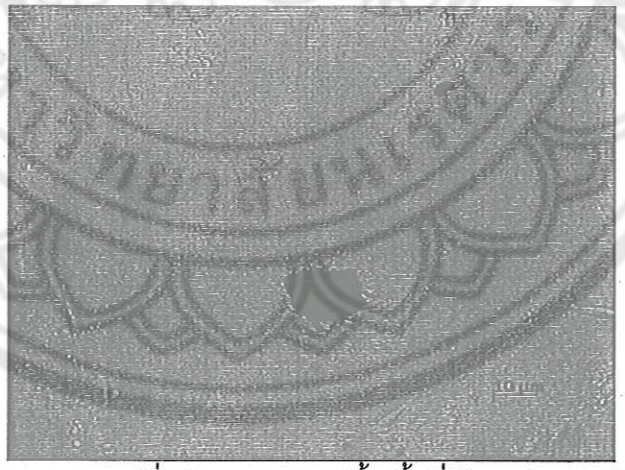
การทดลองทั้งหมด จะทดลองจำนวน 3 ครั้งที่ไม่ขึ้นต่อกัน (3 independent experiment) นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย ด้วย unpaired t-test ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3: ผลการทดลอง

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เป็นการแยกและการตรวจสอบคุณลักษณะของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchyme จากเซลล์โพรงประสาทฟัน ซึ่งแยกได้จากฟันกรามซี่ที่สามของอาสาสมัครผู้มีสุขภาพดี โดยประกอบไปด้วย 2 ส่วนหลัก คือ การแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน

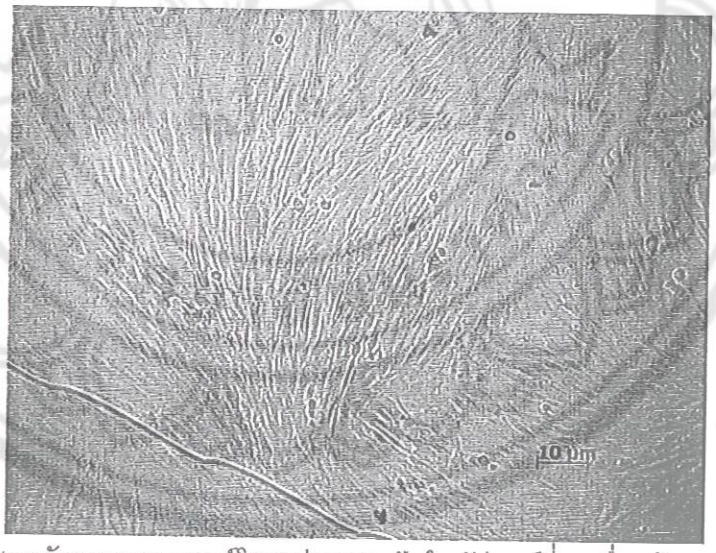
1. การแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน

จากผลการทดลองแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันพบว่า ในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงพบลักษณะของเซลล์เจริญแผ่ออกมาอยู่รอบๆของชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (ดังภาพที่ 8) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 3 พบว่า มีเซลล์ที่มีลักษณะแผ่ออกมาจากชิ้นเนื้อในปริมาณที่มากขึ้นเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (ดังภาพที่ 9) เมื่อเซลล์มีปริมาณมาก ผู้วิจัยจึงได้ทำการนำชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันออกแล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป พบว่า เซลล์ที่แยกได้จากโพรงประสาทฟันมีลักษณะเป็นเซลล์รูปทรงกระสวย (fibroblast-like morphology) ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของเซลล์ที่แผ่ออกมาอยู่รอบชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันในสัปดาห์แรก เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะของเซลล์ที่แผ่ออกมาอยู่รอบชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันในสัปดาห์ที่ 3 เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

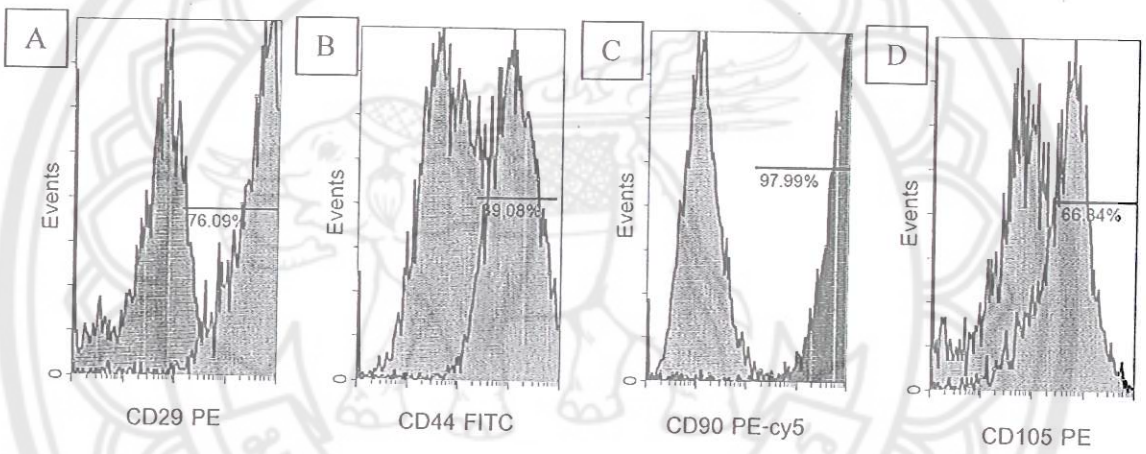


ภาพที่ 10 แสดงลักษณะของเซลล์โพรงประสาทฟันในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

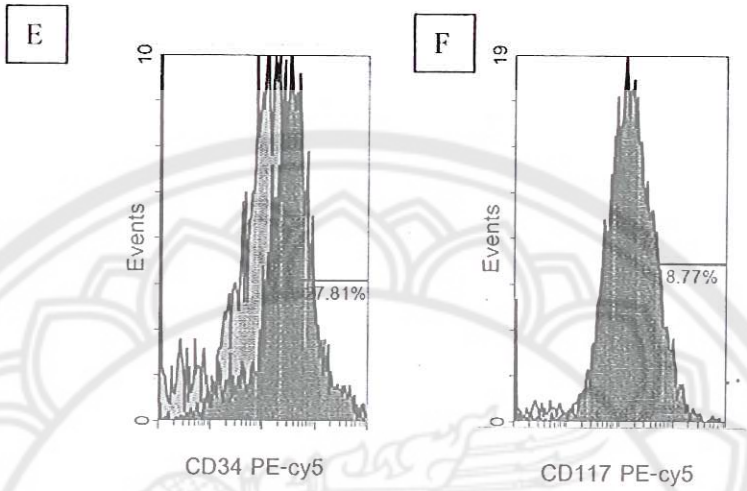
2. การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน

2.1 การตรวจสอบการแสดงออกของโมเลกุลบ่งชี้บนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค Flow cytometry

แกน X คือ fluorescent intensity และแกน Y คือ จำนวนเซลล์ พบว่ากลุ่มประชากรของเซลล์มีการแสดงออกของโมเลกุลบ่งชี้บนผิวเซลล์ชนิด mesenchyme ได้แก่ CD29 76.09%, CD44 89.08%, CD90 97.99%, CD105 66.84% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 11) และมีการแสดงออกของโมเลกุลบ่งชี้บนผิวเซลล์ชนิดเม็ดโลหิตเพียงเล็กน้อย ได้แก่ CD34 27.81%, CD117 18.77% ดังภาพที่ 12 ซึ่งกล่าวได้ว่า เซลล์โพรงประสาทฟันที่ผู้วิจัยแยกได้จากฟันกรามซี่ที่ 3 ของอาสาสมัครนั้น มีคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme



ภาพที่ 11 กราฟฮีสโตแกรมแสดงกลุ่มเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme ภาพ A คือการแสดงออกของ CD29 ภาพ B คือ การแสดงออกของ CD44 ภาพ C คือการแสดงออกของ CD90 และภาพ D คือ การแสดงออกของ CD 105 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ย้อมด้วย Isotype control

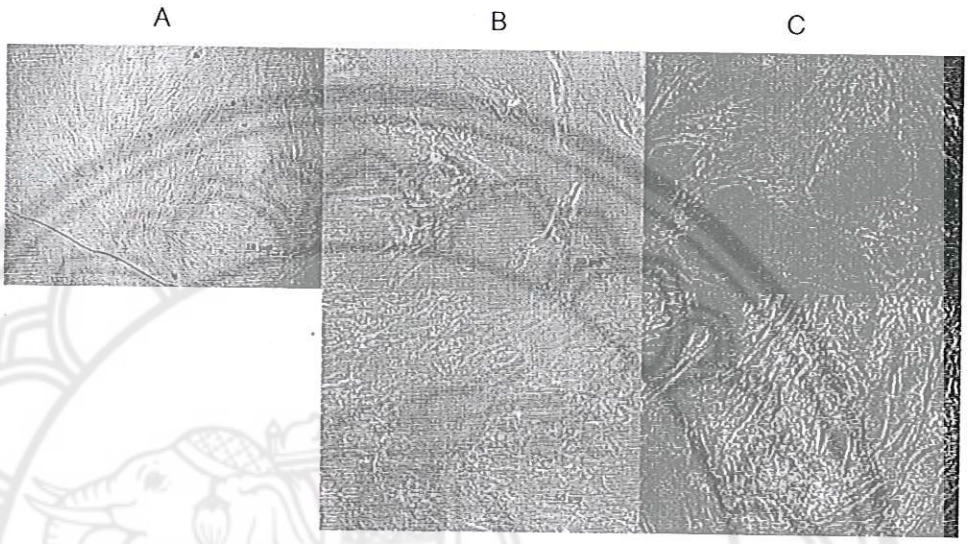


ภาพที่ 12 กราฟฮีสโตแกรมแสดงกลุ่มเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดชนิดเม็ดโลหิต ภาพ A คือ การแสดงออกของ CD 34 และภาพ B คือการแสดงออกของ CD117 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ย้อมด้วย Isotype control

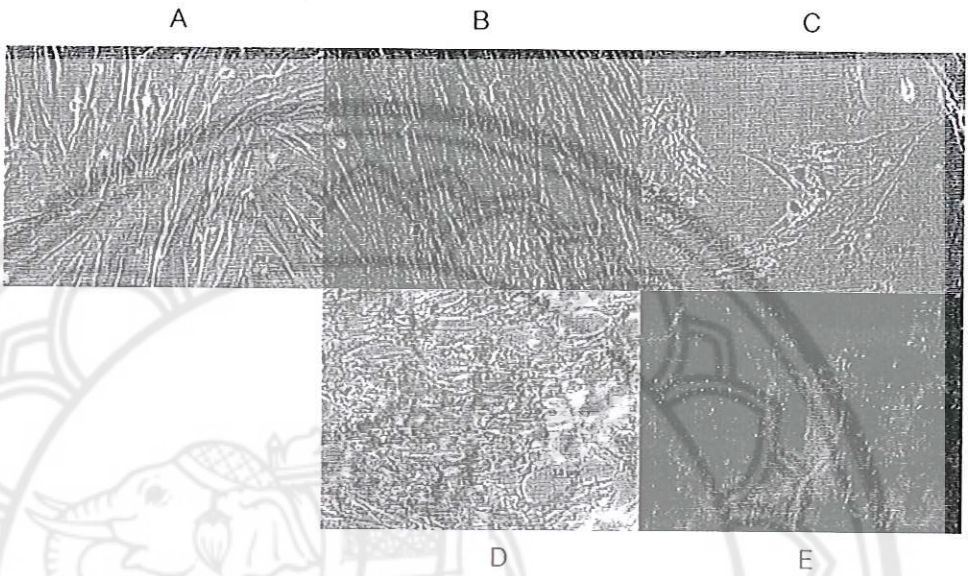
2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะเมื่อได้รับการชักนำ

2.2.1 ผลการศึกษาความสามารถในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์กระดูก

ผลการศึกษาความสามารถในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์กระดูกทั้งกลุ่มที่ได้รับ และไม่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ 5 mg/ml ascorbic 2-phosphate, 10 nM dexamethasone และ 10 mM β glycerol phosphate เป็นระยะเวลา 7 วัน 14 วัน 21 วัน และ 28 วัน จากการถ่ายภาพด้วยกล้อง phase contrast microscope ก่อนย้อมสี alizarin red พบว่ารูปร่างของเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์รูปทรงกระสวยไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์กระดูก (stellate shape) และมีการสะสมของแคลเซียมรอบๆเซลล์ ดังภาพที่ 13 โดยแคลเซียมจะถูกย้อมให้ติดสีแดงด้วยสี alizarin red พบว่ามีการติดสีแดงเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 21 วัน และ 28 วัน ในกลุ่มที่ได้รับอาหารเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์กระดูก ดังภาพที่ 14



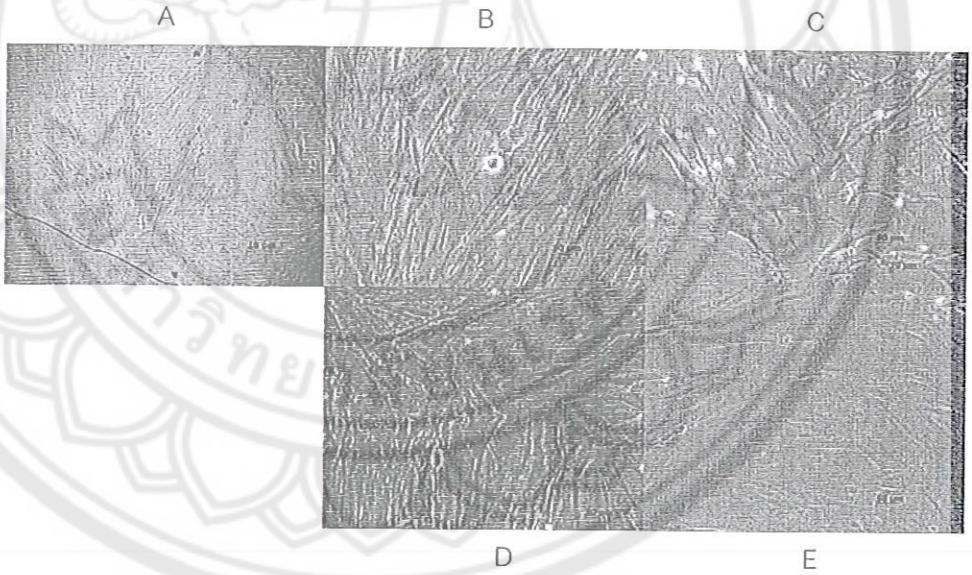
ภาพที่ 13 แสดงการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์กระดูกก่อนย้อมสี alizarin red ที่กำลังขยาย 200 เท่า ที่ 7 วัน (ภาพ B) 14 วัน (ภาพ C) 21 วัน (ภาพ D) และ 28 วัน (ภาพ E) เทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ A) ที่กำลังขยาย 10X



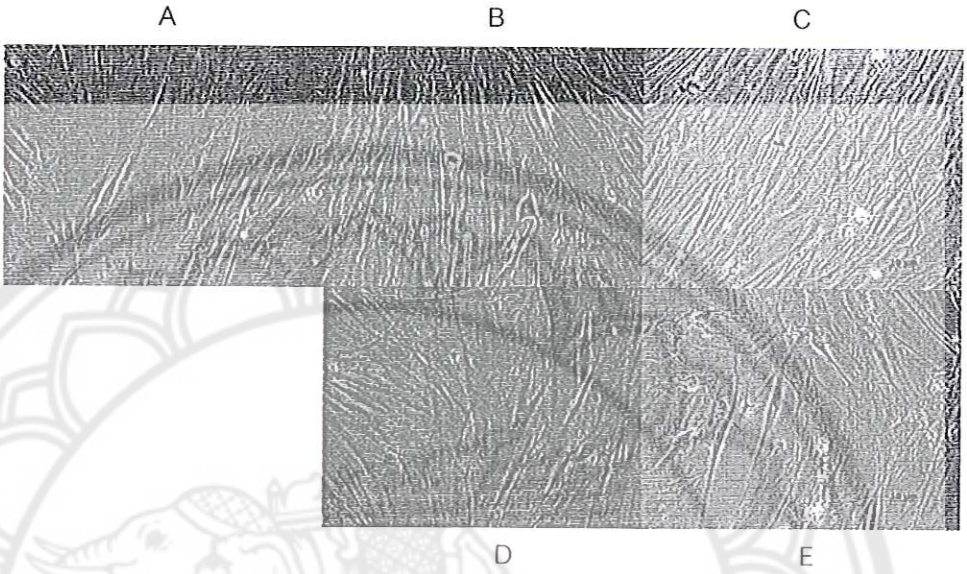
ภาพที่ 14 แสดงการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์กระดูกเมื่อย้อมสี alizarin red ที่กำลังขยาย 200 เท่า ที่ 7 วัน (ภาพ B) 14 วัน (ภาพ C) 21 วัน (ภาพ D) และ 28 วัน (ภาพ E) เทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ A)

2.2.2 ผลการศึกษาความสามารถในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์ไขมัน

ผลการศึกษาความสามารถในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์ ไขมันทั้งกลุ่มที่ได้รับ และไม่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ 50 µg/ml ascorbic 3-phosphate, 100 nM dexamethasone และ 50 µg/ml indomethacine เป็นระยะเวลา 7 วัน 14 วัน 21 วัน และ 28 วัน จากการถ่ายภาพด้วยกล้อง phase contrast microscope ก่อนย้อมสี oil red o พบว่า รูปร่างของเซลล์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์รูปทรงกระสวย ดังภาพที่ 15 โดยเมื่อย้อมด้วยสี oil red o พบว่าไม่มีการติดสีแดงเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน 14 วัน 21 วัน และ 28 วัน ทั้งกลุ่มที่ได้รับ และไม่ได้รับอาหารเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ไขมัน ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 15 แสดงการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์ไขมันก่อนย้อมสี oil red o ที่กำลังขยาย 200 เท่า ที่ 7 วัน (ภาพ B) 14 วัน (ภาพ C) 21 วัน (ภาพ D) และ 28 วัน (ภาพ E) เทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ A)



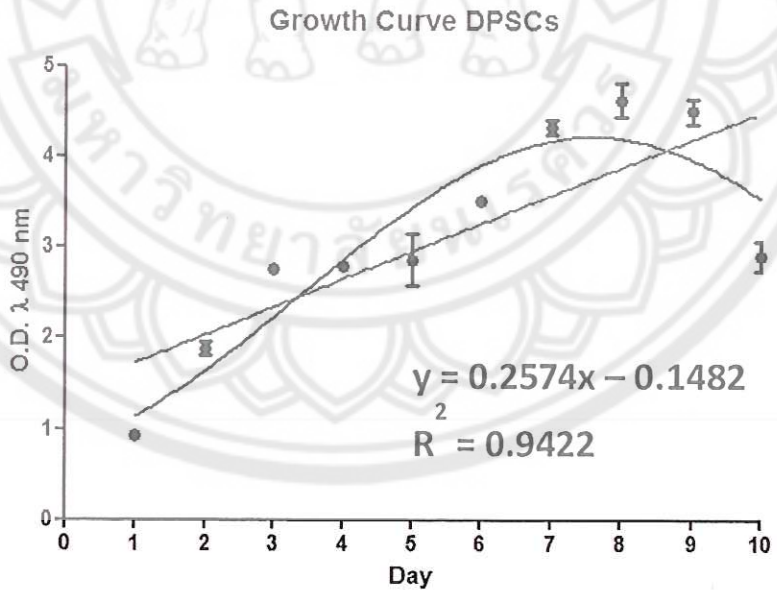
ภาพที่ 16 แสดงการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดโพรงประสาทฟันไปเป็นเซลล์ไขมันเมื่อย้อมสี oil red o ที่กำลังขยาย 200 เท่า ที่ 7 วัน (ภาพ B) 14 วัน (ภาพ C) 21 วัน (ภาพ D) และ 28 วัน (ภาพ E) เทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ A)

2.3 การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาของเซลล์

2.3.1 การเจริญเติบโต

ผลการทดลองจากการคำนวณระยะเวลาการเพิ่มจำนวนประชากรเซลล์เป็น 2 เท่า (Population Doubling Time ; PDT) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันเป็นระยะเวลา 5 วัน ผลการทดลองพบว่าเซลล์ใช้เวลา 34.85 ชั่วโมงในการเพิ่มจำนวนประชากรเซลล์เป็น 2 เท่า

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยแกน X คือระยะเวลาที่ทำการศึกษา และแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm พบว่า การเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้นเป็นในรูปแบบเส้นโค้ง (Sigmoid curve) กล่าวคือเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับเวลาจนเมื่อถึงวันที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์จะเริ่มมีค่าลดลง และเมื่อนำค่ามา plot เป็นกราฟเส้นตรงได้ค่าสมการเชิงเส้น $y = 0.2574x - 0.1482$ และมีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2) = 0.9422 ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน เป็นระยะเวลา 10 วัน

บทที่ 4: วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

Dental pulp stem cell, DPSCs เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่จัดอยู่ในประเภท adult stem cell or somatic stem cell (SS cell) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme มีต้นกำเนิดจาก neural crest (43) มีคุณสมบัติที่สำคัญคือความสามารถแบ่งตัวแล้วได้เซลล์ลักษณะเดิมทดแทนตัวเองได้ (self-renewal) และความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงได้ (differentiation potential) (16) DPSCs สามารถพัฒนาไปเป็น เซลล์กระดูก (osteoblast) เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) และเซลล์ไขมัน (adipose cell) ได้ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติประการหนึ่งสำหรับใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme (34, 44) ซึ่งในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ทำการแยกเซลล์และตรวจสอบเซลล์ที่แยกได้จากฟันกรามซี่ที่สามจากอาสาสมัครที่ทำการถอนฟันกรามซี่ที่สามเพื่อการรักษาพบว่า เซลล์ที่แยกได้จากฟันกรามซี่ที่สามนั้นมีลักษณะเป็นรูปกระสวย (fibroblast-like morphology) เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเหมือนกับลักษณะรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme และเมื่อนำไปตรวจดูโมเลกุลบ่งชี้บนผิวเซลล์ด้วยหลักการ flow cytometry โดยใช้ marker ที่จำเพาะต่อกลุ่ม mesenchymal stem cell และกลุ่ม hematopoietic stem cell (33, 35, 61) พบว่า เซลล์โพรงประสาทฟันมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ในกลุ่ม mesenchymal stem cell ได้แก่ CD29, CD44, CD90 และ CD105 และมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ในกลุ่ม hematopoietic stem cell ได้แก่ CD34, และ CD117 ไม่มากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าเซลล์โพรงประสาทฟันที่แยกได้จากฟันกรามซี่ที่ 3 ของอาสาสมัครแสดงคุณลักษณะคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal หรือ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เซลล์ที่แยกได้มีคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน และเมื่อผู้วิจัยทราบแล้วว่าเซลล์ที่แยกได้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดจึงได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดโดยการเลี้ยงใน

อาหารสำหรับเหนี่ยวนำให้กลายเป็นเซลล์กระดูก (osteocyte) ซึ่งมีส่วนผสมของ 5 mg/ml ascorbic 2-phosphate, 10nM dexamethasone และ 10 mM β-glycerol phosphate และอาหารสำหรับเหนี่ยวนำให้กลายเป็นเซลล์ไขมัน (adipocyte) ที่มีส่วนผสมของ 50 µg/ml ascorbic 3-phosphate, 100 nM dexamethasone และ 50 µg/ml indomethacine ซึ่งได้ทำการทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ดังกล่าวข้างต้นในเวลา 7 วัน 14 วัน 21วัน และ 28 วัน โดยการย้อมสี alizarin red สำหรับกลุ่มเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก และ oil red o สำหรับกลุ่มเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ไขมัน พบว่าเมื่อทำการตรวจดูรูปร่างเซลล์ที่ทำการเหนี่ยวนำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในวันที่ 7 เซลล์ไขมันยังคงมีรูปร่างเป็นแบบกระสวยอยู่ ส่วนเซลล์กระดูกเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแตกต่างไปจากเดิมเล็กน้อย และยังพบว่า มีตะกอนลักษณะสีขาวสะสมอยู่ภายในเซลล์ ในวันที่ 14 เซลล์ไขมันยังคงมีรูปร่างเป็นแบบกระสวย ส่วนเซลล์กระดูกนั้นเซลล์มีรูปร่างที่ต่างไปจากวันที่ 7 และมีการสะสมของตะกอนลักษณะสีขาวภายในเซลล์มากขึ้น และเริ่มมีการย้อมติดสีแดงของ alizarin red เล็กน้อย ในวันที่ 21 และ 28 พบว่าเซลล์มีรูปร่างคล้ายกับเซลล์กระดูก (stellate-like shape) และเซลล์ต้นกำเนิดสามารถเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์กระดูกได้ เนื่องมาจากสังเกตเห็นตะกอนลักษณะสีขาวภายในเซลล์และรอบๆเซลล์ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแคลเซียม และย้อมติดสี alizarin red แต่ในขณะเดียวกันไม่สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้กลายเป็นเซลล์ไขมันได้ สาเหตุที่เป็นไปได้ อาจเกิดจาก 2 สาเหตุ คือ protocol สำหรับการย้อมสี oil red O นั้นไม่เหมาะสม หรือสภาวะสำหรับเหนี่ยวนำนั้นผิดพลาด ทำให้เซลล์ยังคงเป็นรูปร่างแบบ fibroblast โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง

เมื่อทำการตรวจดูคุณลักษณะทางชีววิทยาของเซลล์โดยการตรวจดูจากการคำนวณระยะเวลาการเพิ่มจำนวนประชากรเซลล์เป็น 2 เท่า (Population Doubling Time ; PDT) พบว่าเซลล์มีระยะเวลา

34.85 ชั่วโมงในการเพิ่มจำนวนประชากรเซลล์เป็น 2 เท่าและเมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟัน เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า การเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้นเป็นในรูปแบบเส้นโค้ง (Sigmoid curve) กล่าวคือเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับเวลา จนเมื่อถึงวันที่ 7 ค่าการดูดแสงของเซลล์จะเริ่มมีค่าลดลง เนื่องมาจากเซลล์มีการเจริญเติบโตเต็มพื้นผิวของภาชนะทำให้เซลล์เกิดการยับยั้งการเกาะพื้นผิว (attach inhibition) จึงหยุดการเจริญเติบโตและเริ่มมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จึงมีค่าลดลง

ข้อจำกัดในการทำวิจัยของคณะผู้วิจัยคือไม่มีการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction ซึ่งเป็นการตรวจสอบในระดับ genotype โดยทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน PPAR-α และ PPAR-γ ของเซลล์ไขมัน และยีน Runx2 และ Osteocalcin ของเซลล์กระดูก และทางคณะผู้วิจัยยังไม่สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้กลายเป็นเซลล์ไขมันได้ซึ่งผู้วิจัยควรทำการตรวจสอบสภาวะอาหารที่ใช้เหนี่ยวนำอีกครั้งแล้วทำการชักนำให้กลายเป็นเซลล์ไขมันและทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นโดยการย้อมสี oil red O อีกครั้ง นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยควรจะทำการทดสอบการแสดงออกของยีนของเซลล์ต้นกำเนิด เช่น Oct4 และ Nanog ด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction เพื่อเป็นการยืนยันผลว่าเซลล์โพรงประสาทฟันที่ผู้วิจัยแยกได้นั้นเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจริงเพราะมีการแสดงออกของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในระดับยีน และเมื่อได้ผลการทดสอบว่าเซลล์ที่แยกได้นั้นเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจริง คณะผู้วิจัยจะใช้เซลล์ที่ได้นั้นในการเปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์ชนิดอื่นที่น่าสนใจและมีประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น interstitial cell ของลิ้นหัวใจ จะเป็นพื้นฐานในการนำมาใช้ในการรักษาโรคลิ้นหัวใจ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. Annu Rev Cell Dev Biol. 2009;25:377-406.

2. Martinez-De Luna RI, Zuber ME. Putting regeneration into regenerative medicine. J Ophthalmic Vis Res. 2014;9(1):126-33.

3. Kiatpongsan S, Tannirandorn Y, Virutamasan P. Introduction to stem cell medicine. J Med Assoc Thai. 2006;89(1):111-7.

4. Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov Friedman S, Shezen E, Hornstein E, et al. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. Stem Cells. 2006;24(2):221-9.

5. นเรศ คำรงชัย, บรรณาธิการ. ผลกระทบด้านจริยธรรมของการศึกษาวิจัย Stem Cell, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 2002.

6. Daley GQ, Ahrlund Richter L, Auerbach Jm, Benvenisty N, Charo Ra, Chen G, et al. Ethics. The ISSCR guidelines for human embryonic stem cell research. Science. 2007;315(5812):603-4.

7. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells. Arch Surg. 2004;139:93-9.

8. Ratajczak Mz, Jadczyk T, Pedziwiatr D, Wojakowski W. New advances in stem cell research: practical implications for regenerative medicine. Pol Arch Med Wewn. 2014;124(7-8):417-26.

9. Tuch BE. Stem cells a clinical update. Reprinted from Australian Family Physician. 2006;35(9):719-21.

10. Navabazam AR, Sadeghian Nodoshan F, Sheikhha MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. Iran J Reprod Med. 2013;11(3):235-42.

11. Atari M. BM, et al. Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. Histol Histopathol. 2011;26:1057-70.

12. Kerkis I., Kerkis A. DD, et al,. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs. 2006;184(3-4):105-16.

13. Raoof M, Yaghoobi MM, Derakhshani A, Kamal-Abadi AM, Ebrahimi B, Abbasnejad M, et al. A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. Dent Res J. 2014;11(2):244-50.

14. Hadaegh Y, Niknam M, Attar A, Maharlooei Mk, Tavangar Ms, Aarabi Am, et al. Characterization of stem cells from the pulp of unerupted third molar tooth. Indian J Dent Res. 2014;25(1):14-21.

15. Kitagawa M, Ueda H, Iizuka S, Sakamoto K, Oka H, Kudo Y, et al. Immortalization and characterization of human dental pulp cells with odontoblastic differentiation. Arch Oral Biol. 2007;52(8):727-31.

16. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells. 1978;4(1-2):7-25.

17. Lopez MJ, Jarazo J. State of the art: stem cells in equine regenerative medicine. Equine Vet J. 2014. doi: 10.1111/evj.12311.

18. ดร.ทัศนีย์ เพิ่มไทย. ความรู้เบื้องต้นของชีววิทยาเซลล์ต้นกำเนิด. กันยายน-ธันวาคม 2554 ปีที่ 4 ฉบับที่ 3.

19. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell. 2008;132(4):567-82.

20. Huang AH, Snyder Br, Cheng Ph, Chan AW. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. Stem Cells. 2008;26(10):2654-63.

21. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998;282(5391):1145-7.

22. Rong Z, Fu X, Wang M, Xu Y. A scalable approach to prevent teratoma formation of human embryonic stem cells. J Biol Chem. 2012;287(39):32338-45.

23. Aging. Embryonic stem cell. Available from: http://www.impactaging.com/papers /v3/n5/full/100328.html.

24. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663-76.

25. Masthan KMK. Mystery inside the tooth: The dental pulp stem cells. J Clin Diagn Res. 2013;7(5):945-7.

26. Barrilleaux B, Phinney Dg, Prockop Dj, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. Tissue Eng. 2007;12(11):3007-19.

27. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells. 2003;21(1):105-10.

28. Stem Cell Thailand. Somatic stem cell. Available from: http://stemcellthailand.org /somatic-stem-cells-vs-embryonic-derived-stem-cell-treatment/2/.

29. รัฐพงษ์ วรวงศ์วสุ, บรรณาธิการ. วิทยาเนื้อเยื่อช่องปาก (oral histology). กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหามงกุฎราชวิทยาลัย 2553.

30. Ross, Michael H. K, G.I. and Pawlina W, editors. Histology: a text and atlas. Philadelphia ; London : Lippincott Williams & Wilkins 2003.

31. Britannica Kids. Cross section of an adult human molar. Available from: http://kids.britannica.com/elementary/art-112882/Cross-section-of-an-adult-human-molar.

32. Rickne C. Scheid, Gabriela Weiss, editors. WOELFEL's Dental anatomy. 8 ed. Philadelphia ; Wotters Kluwer Health/Lippincott William & wilkins 2012.

33. Woods EJ, Perry Bc, Hockema Jj, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. Cryobiology. 2009;59(2):150-7.

34. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 December 5, 2000;97(25):13625-30.

35. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang Fc, Byers Ma, Chu Tm, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. Tissue Eng Part C Methods. 2008;14(2):149-56.

36. Acharya A, Shetty S, Deshmukh V. Periodontal ligament stem cells: an overview. J Oral Biosci. 2010;52(3):275-82.

37. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13, 2003;100(10):5807-12.

38. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. Int Endod J. 2009;42(11):955-62.

39. Didilescu AC, Rusu Mc, Nini G. Dental pulp as a stem cell reservoir. Rom J Morphol Embryol. 2013;54(3):473-8.

40. Chen YK, Huang Ah, Chan Aw, Lin LM. Human dental pulp stem cells derived from cryopreserved dental pulp tissues of vital extracted teeth with disease demonstrate hepatic-like differentiation. J Tissue Eng. 2013. doi: 10.1002/term.1763.

41. Lei M, Li K, Li B, Gao LN, Chen FM, Jin Y. Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. Biomaterials. 2014 Aug;35(24):6332-43.

42. Choi JK, Hwang HI, YJ. J. The efficiency of the in vitro osteo/dentinogenic differentiation of human dental pulp cells, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. Int J Mol Med. 2014 Oct 29. doi: 10.3892/ijmm.2014.1986.

43. Peters H, Balling R. Teeth: where and how to make them. Trends Genet. 1999;15(2):59-65.

44. Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. J Craniofac Surg. 2006;17(3):511-5.

45. Pushpalatha C, Nimbal A, Jain S, Tammannavar P. Dental pulp cells scope in dentistry. IOSR-JDMS. 2013;8(1):38-41.

46. Ahmed N, Aboul-Ezz E, Zakhary S, El Badry T, Ramzy M. Isolation of dental pulp stem cells and their In vitro differentiation into odontoblast-like cells. MJMS. 2011;4:253.

47. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. Transfus Med Hemother. 2009;59(2):150-7.

48. Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, Garcia-Fernandez D, Barajas M, Carrasco Ma, et al. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. J Cell Sci. 2012;125(14):3343-56.

49. Zhang W, Walboomers Xf, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. Tissue Eng. 2006;12(10):2813-23.

50. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002;81(8):531-5.

51. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo Bm, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. Plos One. 2006;1(1).

52. Carnevale G, Riccio M, Pisciotta A, Beretti F, Maraldi T, Zavatti M, et al. In vitro differentiation into insulin-producing β-cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. Dig Liver Dis. 2013;45(8):669-76.

53. Singh LW. Traditional medicinal plants of Manipur as anti-diabetics. J Med Plants Res. 2011;5(5):677-87.

54. Guimaraes ET, Cruz Gda S, Almeida Tf, Souza Bs, Kaneto Cm, Vasconcelos Jf, et al. Transplantation of stem cells obtained from murine dental pulp improves pancreatic damage, renal function, and painful diabetic neuropathy in diabetic type I mouse model. Cell Transplantation. 2013;22(12):2345-54.

55. Kerkis I, Ambrosio Ce, Kerkis A, Martins Ds, Zucconi E, Fonseca Sa, et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? J Transl Med. 2008;6:35.

56. Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo Jm, Lledo E, Ruiz A, Minana Md, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. Stem Cells. 2008 20080314;26(3):638-45.

57. Gomes JA, Geraldes Monteiro B, Melo Gb, Smith Rl, Cavenaghi Pereira da Silva M, Lizier Nf, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;54(12):7544-56.

58. Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(12):7544-56.

59. Khorsand A, Eslaminejad MB, Arabsolghar M, Paknejad M, Ghaedi B, Rokn AR, et al. Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue. J Oral Implantol. 2013;39(4): 433-43.

60. Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. Stem Cells. 2008;26(10):2654-63.

61. Mohamadreza Baghaban Eslaminejad, Hamid Nazarian MS, Sourena Vahabi FF. Isolation and in vitro characterization of mesenchymal stem cells derived from the pulp tissue of human third molar tooth. Iran J Med Sci. 2010;35:216-25.

62. Experts KS. Counting chamber. Available from: http://lifescience.kinesis.co.uk /products-page/life-science/brand-general-consumables-counting-chamber-blaubrand-neubauer-pattern-ivd-with-spring-clips-double-ruling/#.U6FKMvmSxQE.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมน้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM)

1.1 Heat inactive fetal bovine serum ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที

1.2 เติม heat inactive fetal bovine serum 75 ml ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) ที่มีปริมาตร 500 ml

1.3 เติม penicillin 100 IU/ml streptomycin 100 µg/ml ลงไปในอาหารข้อ 1.2

2. Phosphate buffer saline (1000 ml)

Phosphate buffer saline ชนิดเม็ด 1 เม็ดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml

3.การเตรียม working MTT

MTT	5 ml
PBS	45 ml

4. การเตรียม Alizarin red working solution (40 mM ARS, pH 4.1 - 4.3)

ข้อควรระวัง : หลีกเลี่ยงการสัมผัส และการสูดดม ทำการเตรียม Alizarin red working solution ใหม่ทุกครั้งเมื่อจะใช้ พร้อมทั้งปิดฝาให้แน่น และที่สำคัญต้องปรับให้มีค่า pH สุดท้ายอยู่ที่ 4.1 - 4.3

4.1 ละลาย 0.7 g Alizarin Red S (Sigma-Aldrich A5533) ใน 25 ml ของ DI

4.2 ปรับ pH ให้เป็น 4.1 - 4.3 ด้วย 0.5% NH_4OH (แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์)

4.3 ปรับให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ ทำการติดตาม และปรับ pH หากจำเป็น

5. การเตรียม oil red O

5.1 เตรียม stock solution โดยชั่ง 300 mg ของ oil red o powder แล้วเติม 100 ml ของ 99% isopropanol ซึ่งสารละลายนี้จะมีความจะมีความคงสภาพได้ 1 ปี หลังจากวันที่เตรียม

5.2 ผสม 3 ส่วน (30 ml) ของ oil red o stock solution กับสองส่วน (20 ml) DI water ในตู้ดูดควัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที โดย working solution ที่เตรียมจะมีความคงตัวไม่เกิน 2 ชั่วโมง

5.3 นำกระดาษกรองเบอร์ 1 มาใส่กรวย แล้วนำกรวยใส่ในขวดปริมาตร 125 ml

5.4 กรอง oil red o working solution จนหมด โดยค่อยเติมสารละลายลงไปอย่างช้าๆ ไม่ให้ล้นกรวยกรอง

6. การเตรียม FAC buffer

5-10 % fetal bovine serum

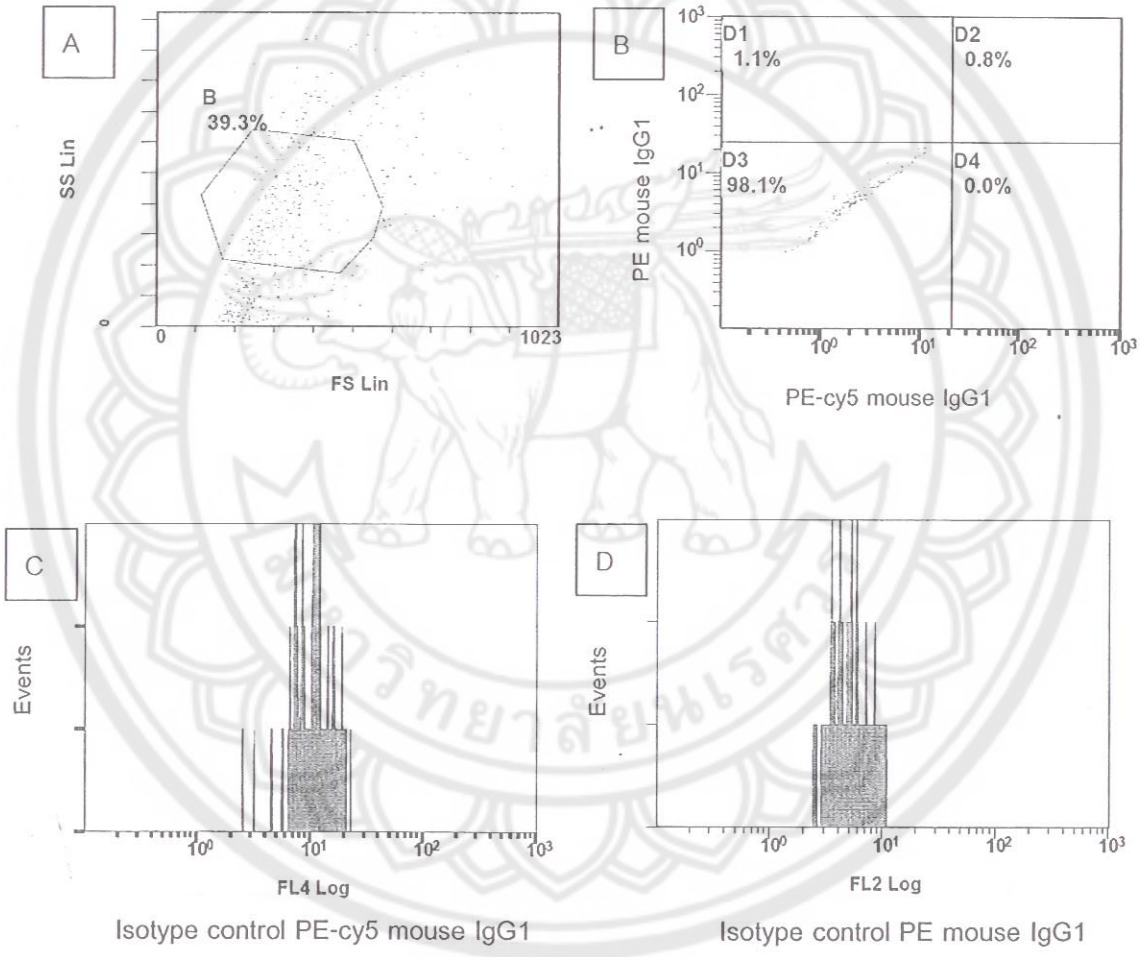
0.1 % NaN_3

PBS

ภาคผนวก ข

ผลการตรวจสอบโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วยหลักการ flow cytometry

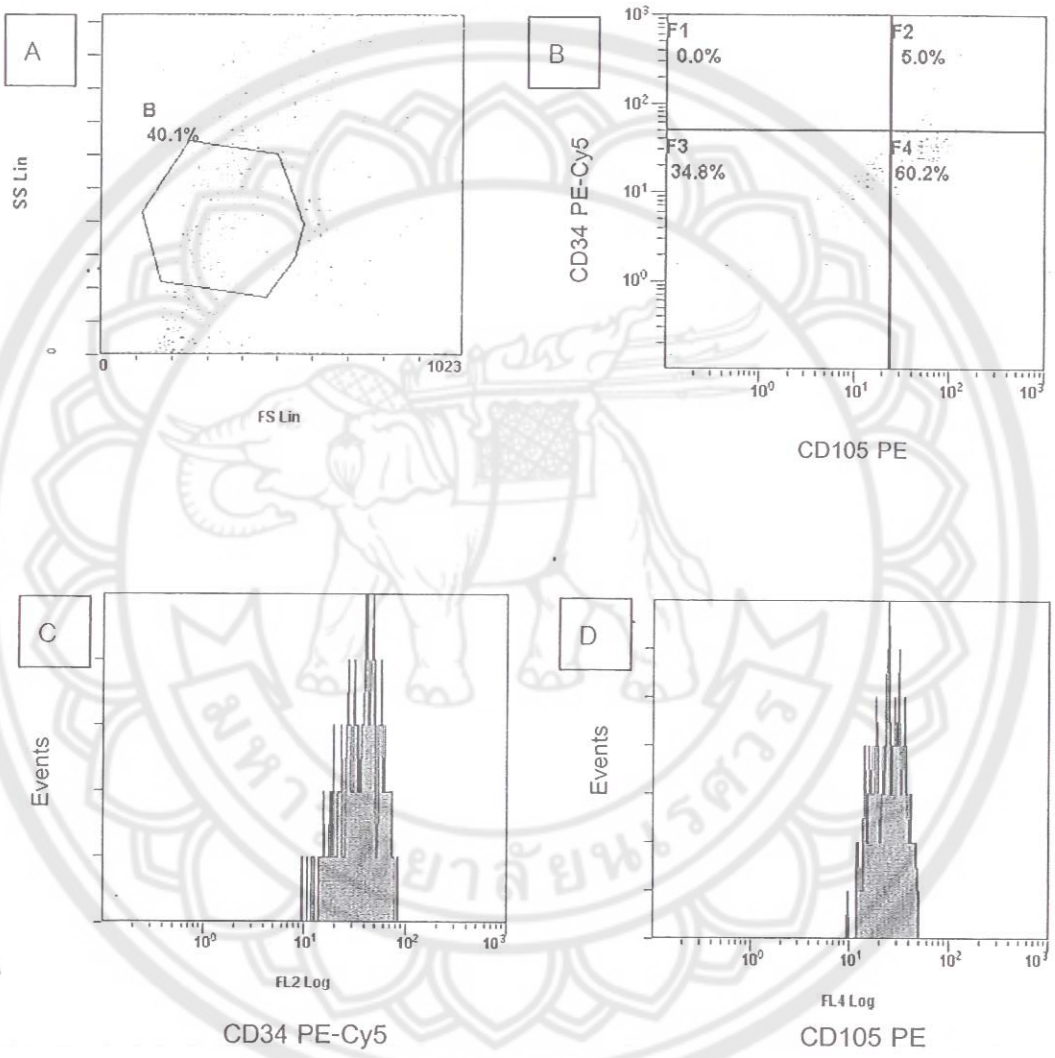
Isotype control PE-cy5 mouse IgG1 และ Isotype control PE mouse IgG1 undiluted



Isotype control PE-cy5 mouse IgG1 Isotype control PE mouse IgG1

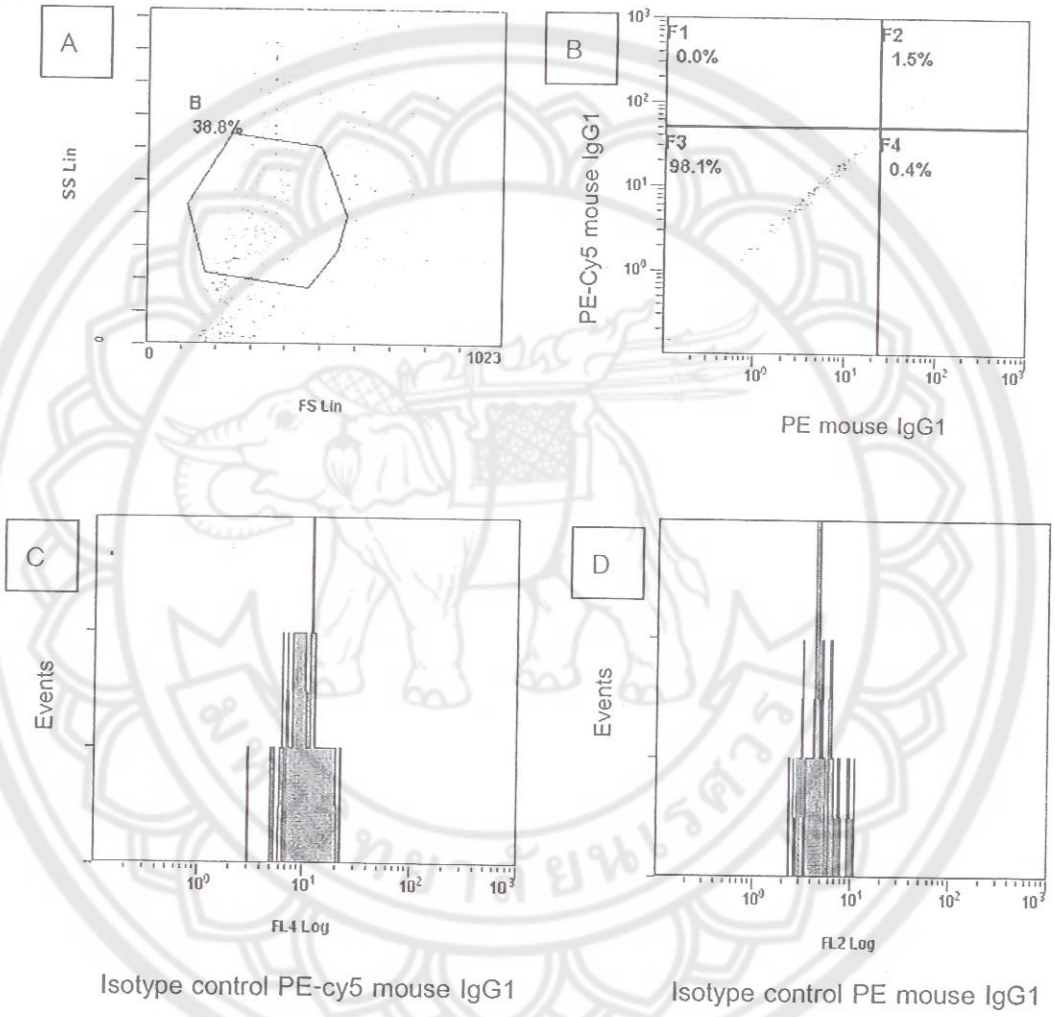
ภาพที่ 1 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

CD34 PE-Cy5 และ CD105 PE undiluted



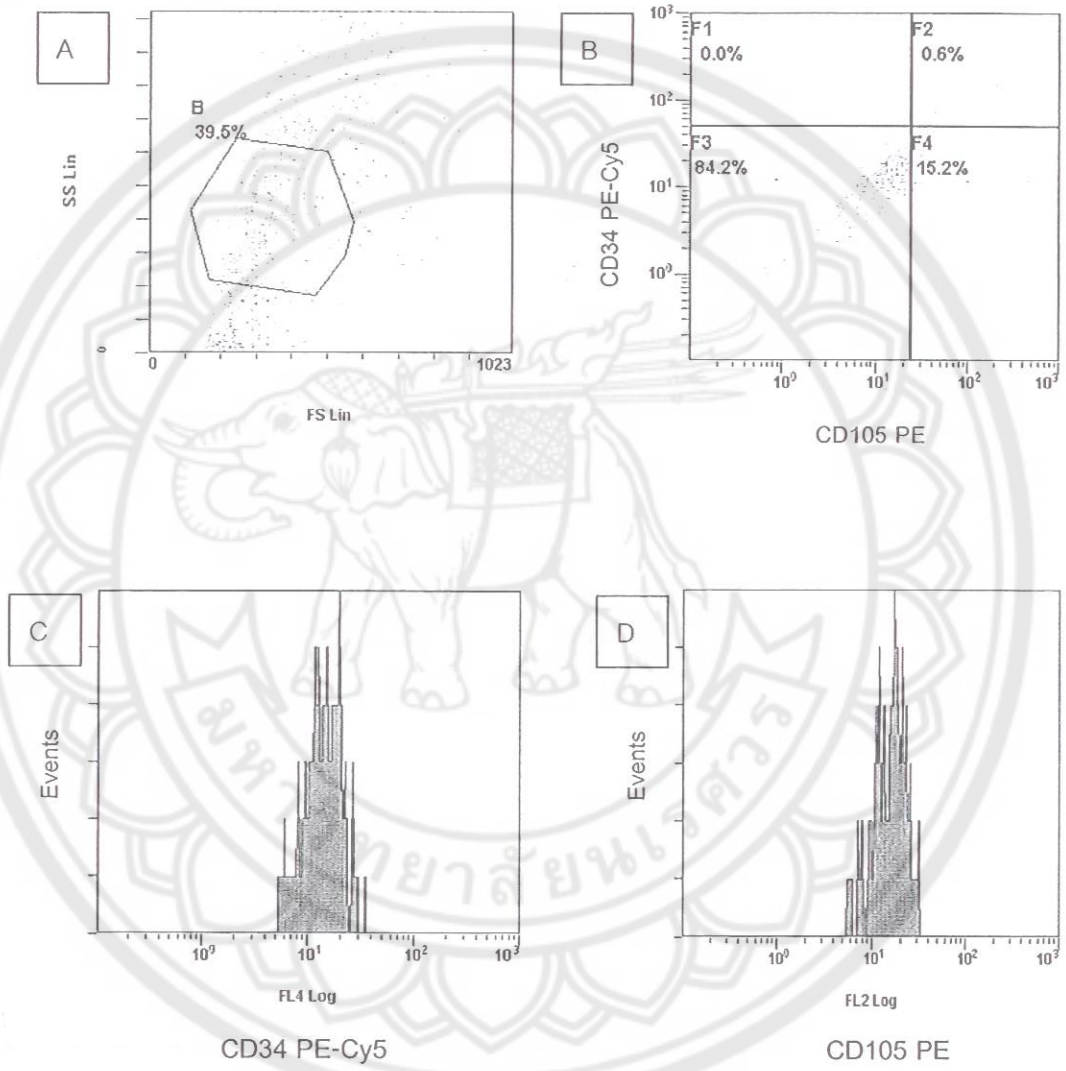
ภาพที่ 2 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

Isotype control PE-cy5 mouse IgG1 และ Isotype control PE mouse IgG1 diluted 1:100



ภาพที่ 3 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

CD34 PE-Cy5 และ CD105 PE diluted 1:100

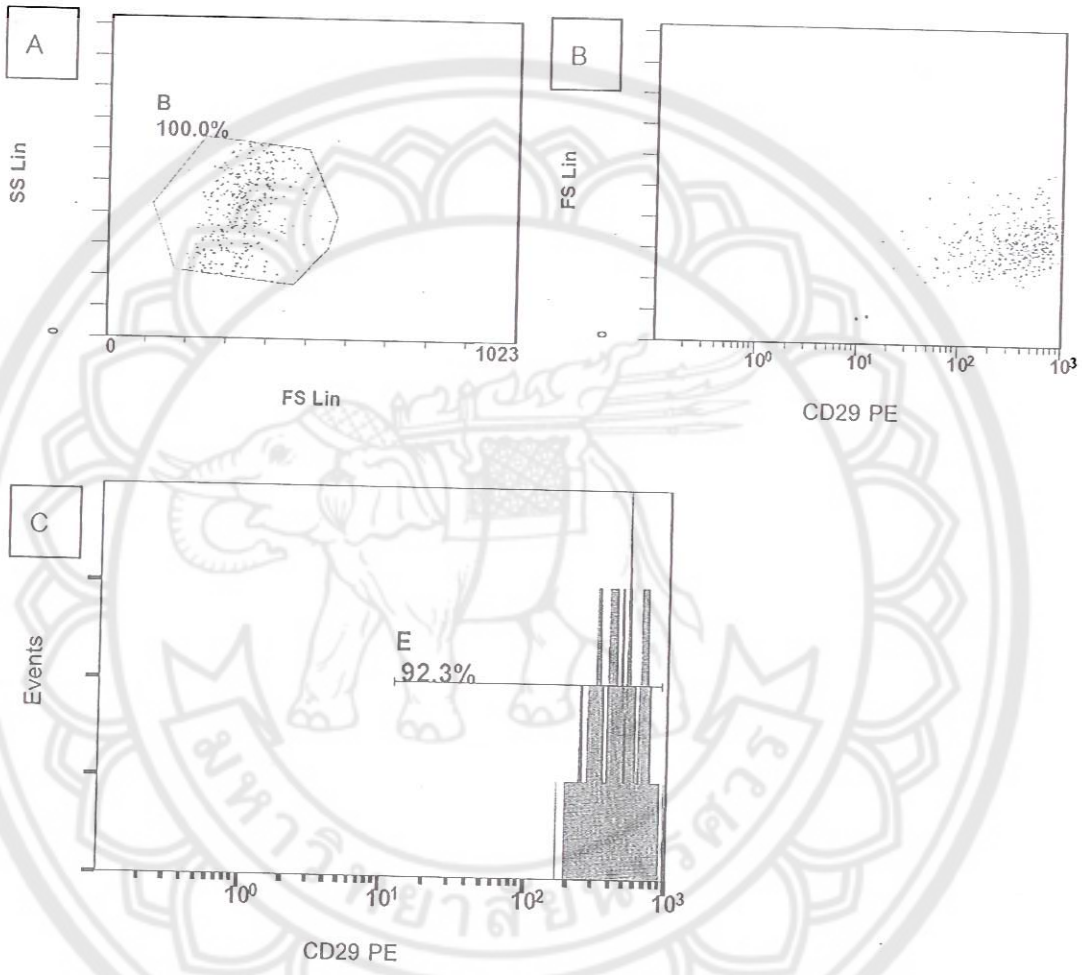


ภาพที่ 4 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

Isotype control PE mouse IgG1 undiluted

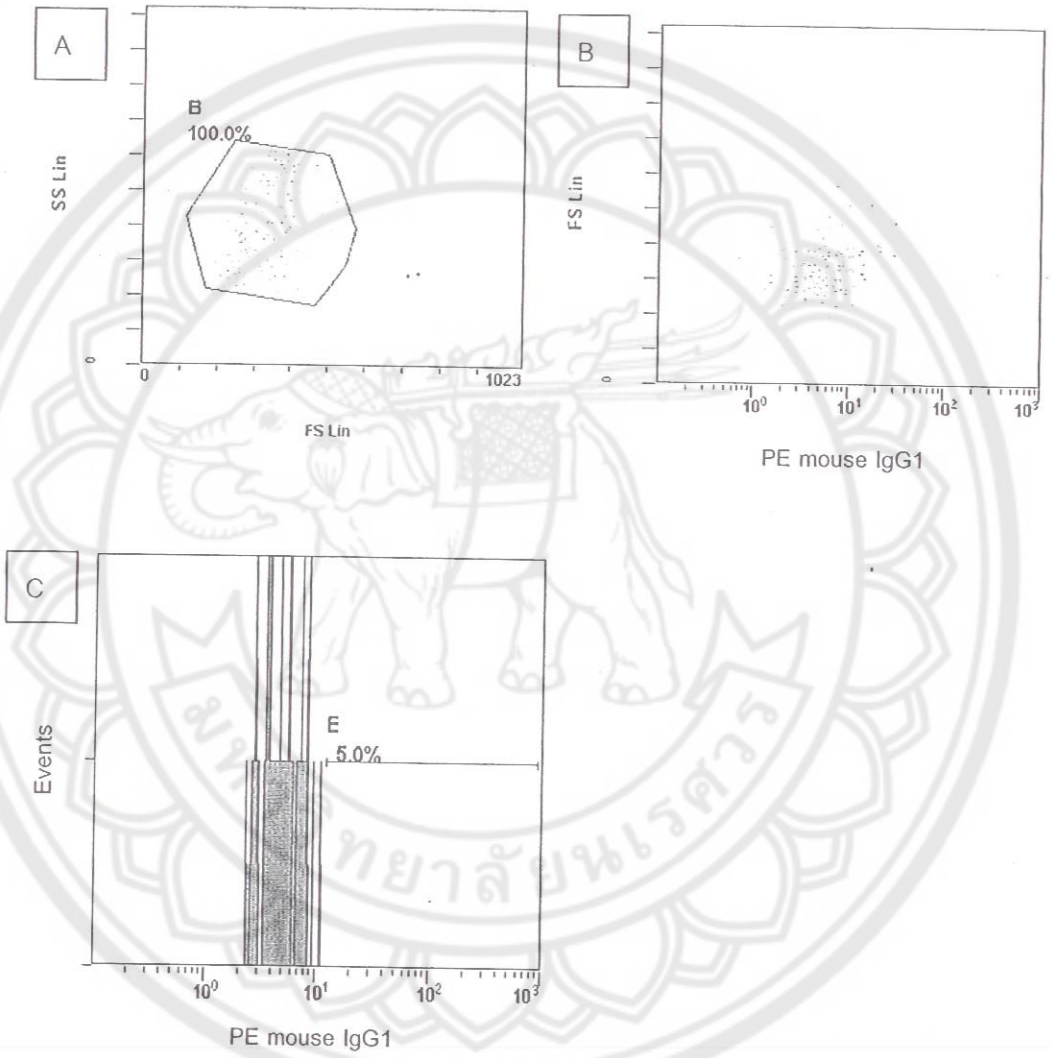
ภาพที่ 5 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

CD29 PE undiluted



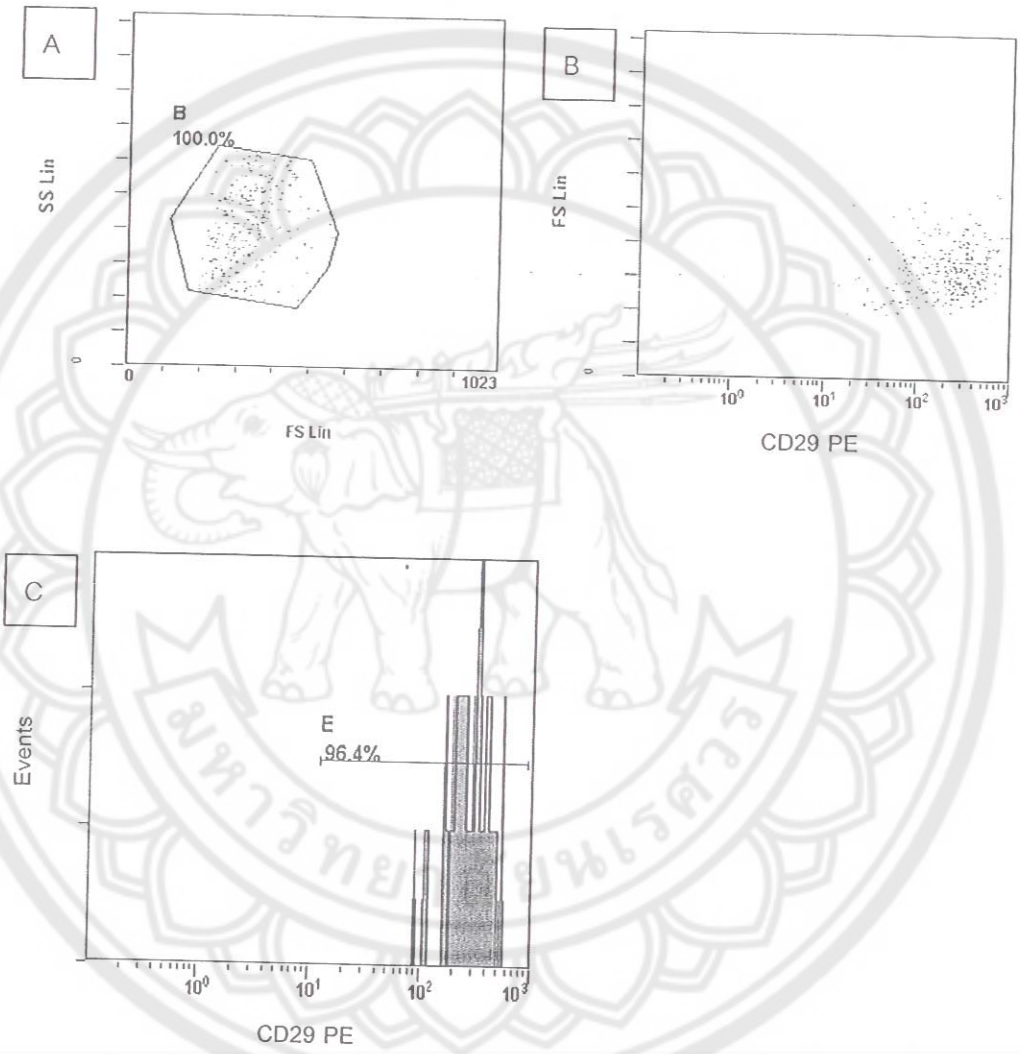
ภาพที่ 6 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

Isotype control PE mouse IgG1 diluted 1:100



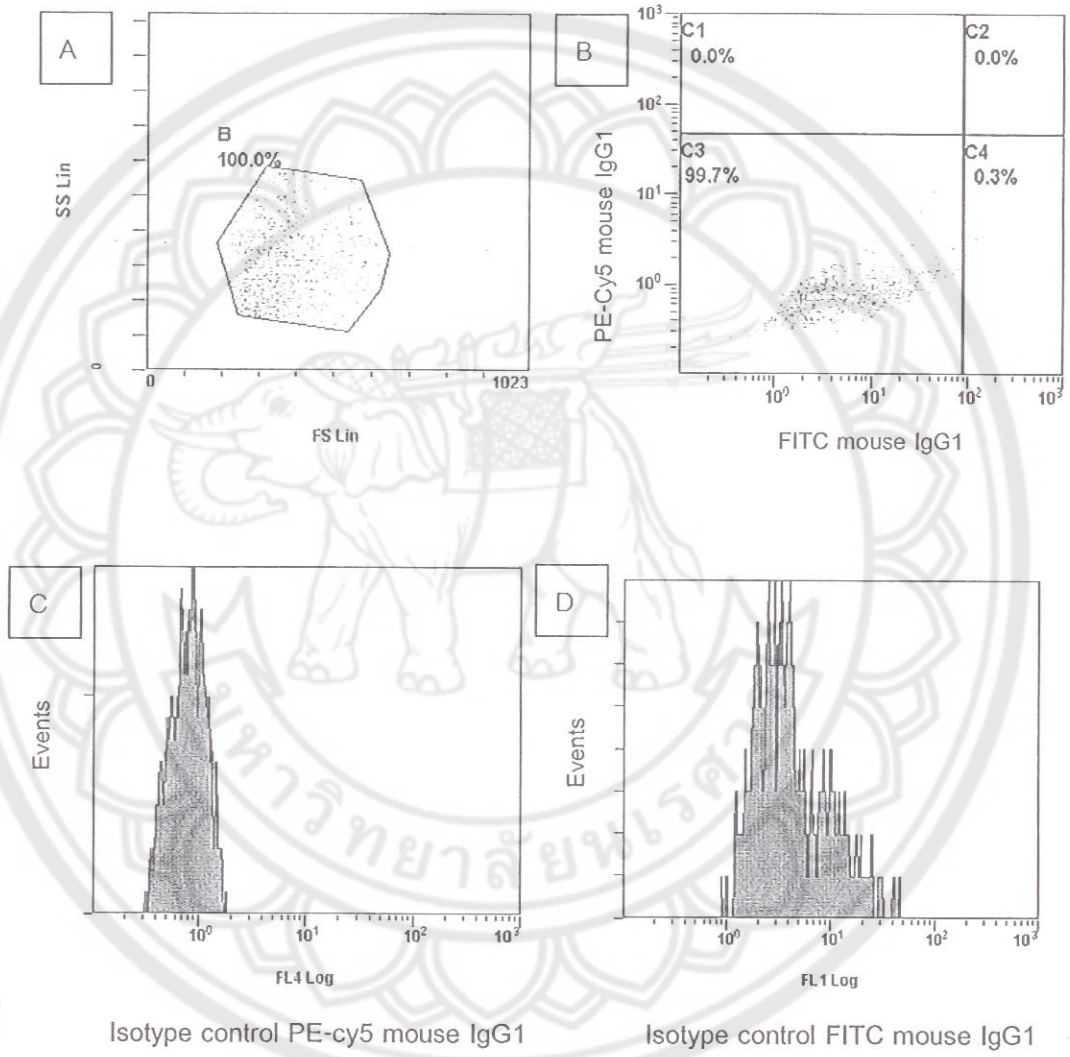
ภาพที่ 7 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

CD29 PE diluted 1:100



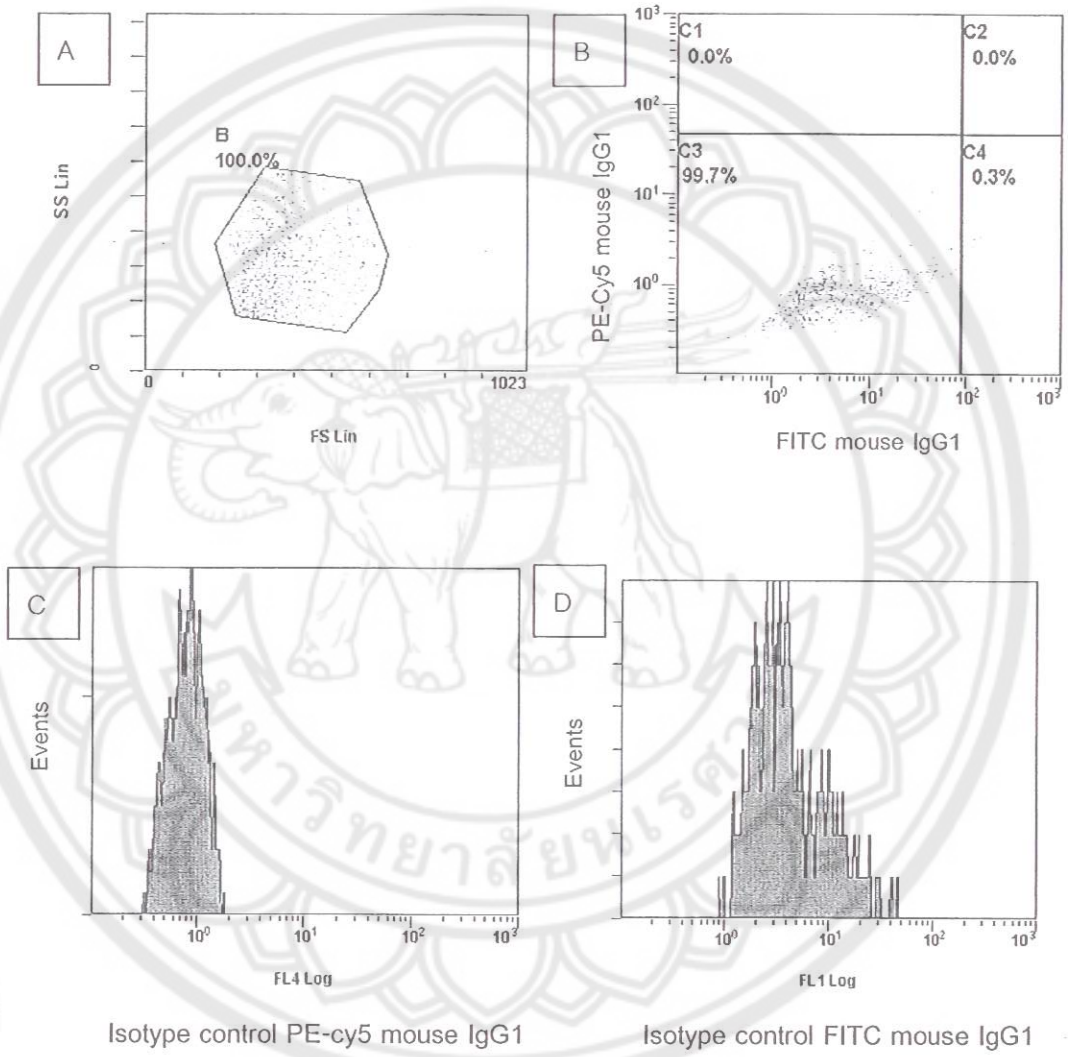
ภาพที่ 8 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

Isotype control PE-cy5 mouse IgG1 และ Isotype control FITC mouse IgG1



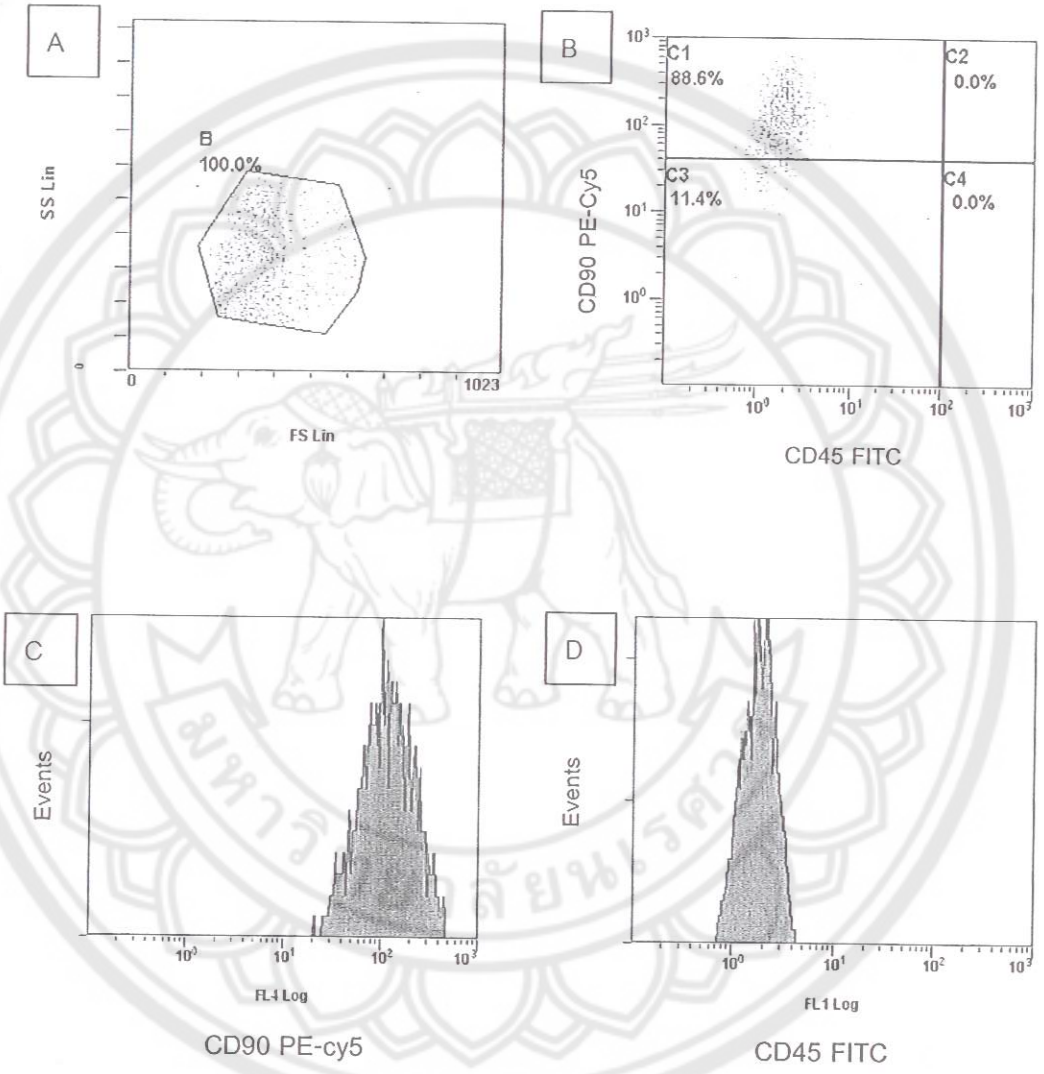
ภาพที่ 9 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

Isotype control PE-cy5 mouse IgG1 และ Isotype control FITC mouse IgG1



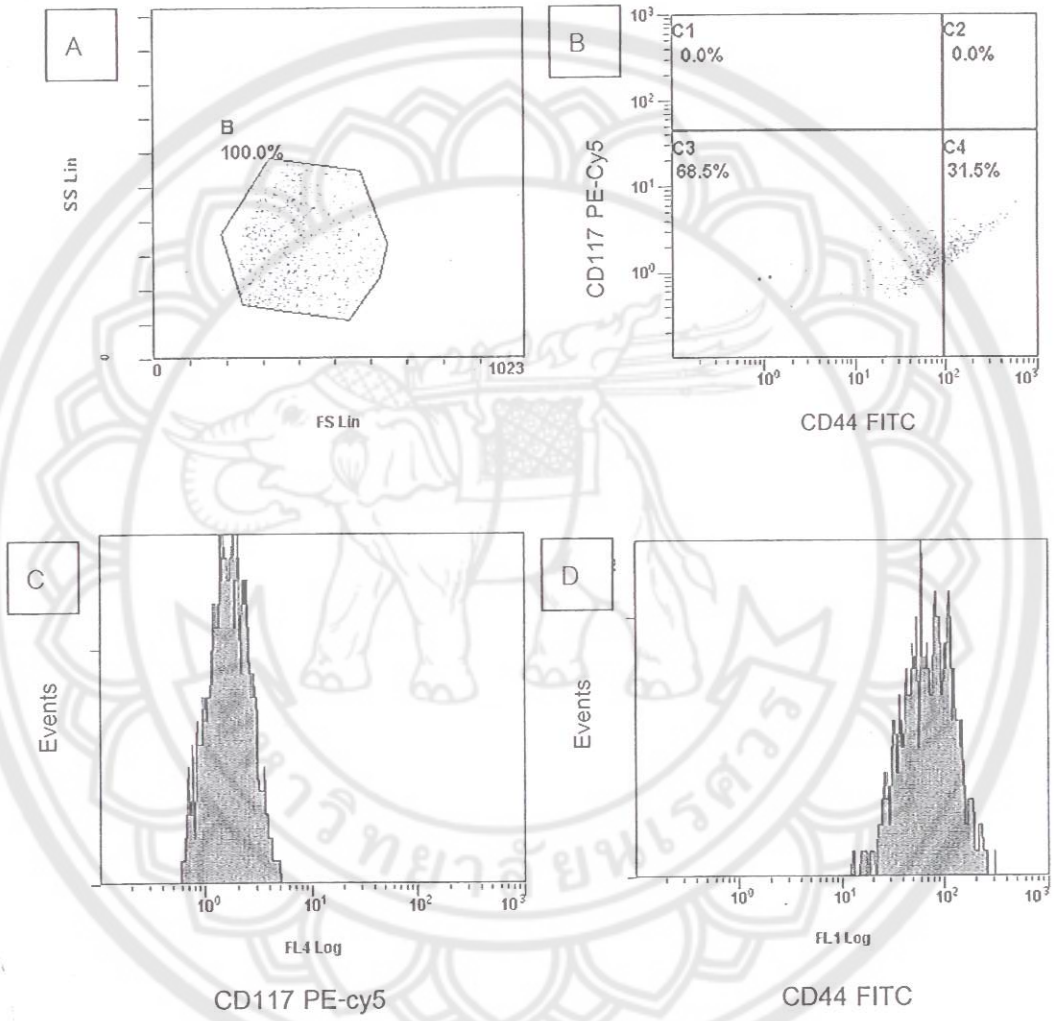
ภาพที่ 9 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

CD90 PE-cy5 และ diluted 1:50 CD45 FITC



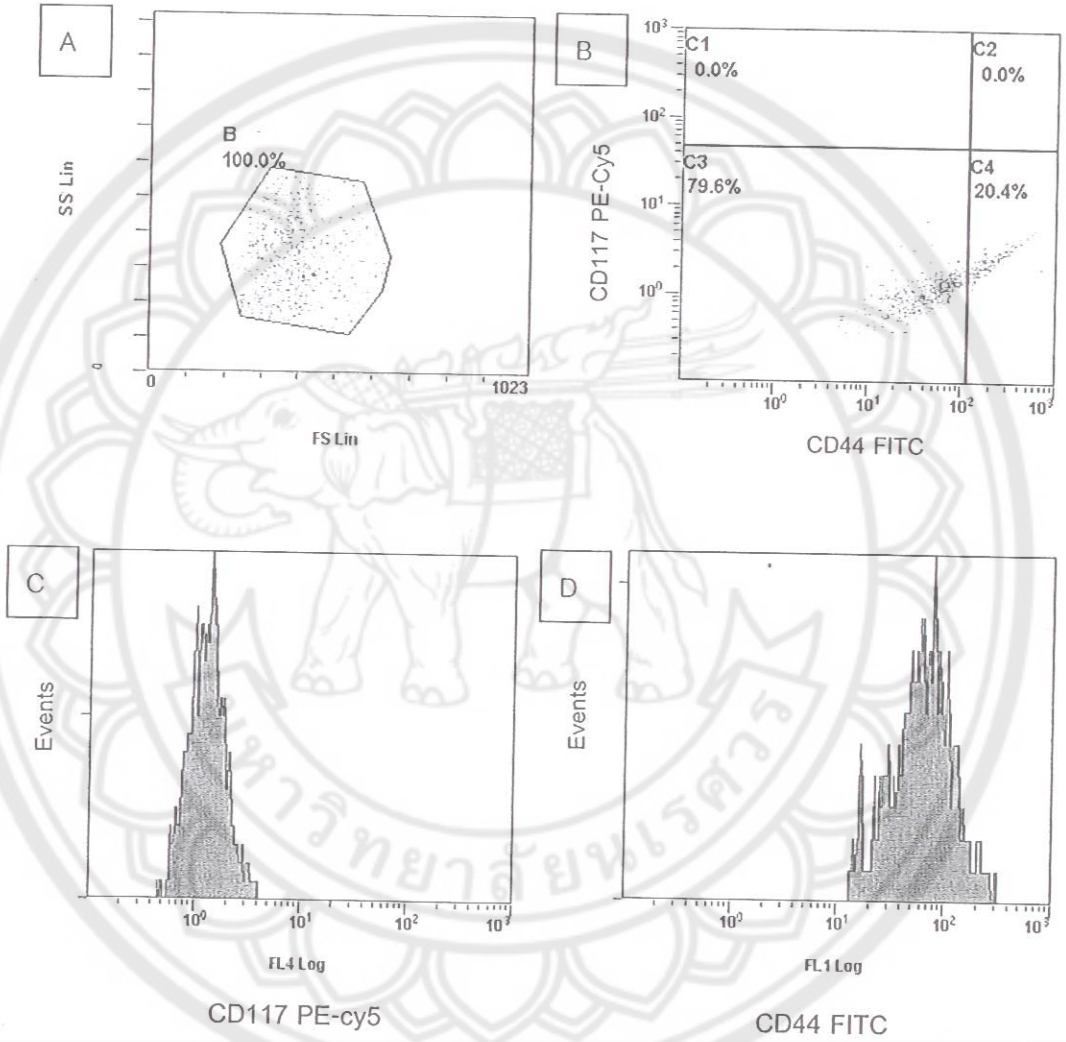
ภาพที่ 11 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

CD117 PE-cy5 และ CD44 FITC



ภาพที่ 12 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

Diluted 1:50 CD117 PE-cy5 และ CD44 FITC



ภาพที่ 13 A คือ การเลือกกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจ B คือ เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟ Dot-plot C และ D คือการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์แสดงเป็นกราฟฮีสโตแกรม

ภาคผนวก ค
เอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์

เอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อโครงการ	การชักนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์สู่เซลล์ชนิด Insterstitial cell ของลิ้นหัวใจ Induction of human dental pulp stem cell to valvular interstitial cell
ชื่อหัวหน้าโครงการ	ดร.ทนพ.สราวุธ คำป่วน
เลขสำคัญโครงการ	HE 55-Ex1-0069 (Version 1.0)
เลขที่รับรองโครงการ	55 01 04 0009
สังกัดหน่วยงาน/คณะ	สหเวชศาสตร์
การรับรอง	ขอรับรองโครงการวิจัยดังกล่าวข้างบนนี้ได้ผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร กลุ่มสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ครั้งที่ 6/2555 เมื่อวันที่ 23 กรกฎาคม 2555
วันสิ้นสุดการรับรอง	วันที่ 23 กรกฎาคม 2556
ประเภทการรับรอง	รับรองแบบยกเว้น

ลงนาม

(นายแพทย์สมโรจน์ ตันสุภสวัสดิกุล)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
กลุ่มสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาคผนวก ง

หนังสือแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัย

แบบฟอร์ม ECNU05

สำหรับเจ้าหน้าที่ เลขที่ HE.....

หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัย

(Informed consent form)

โครงการวิจัยเรื่อง การชักนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์สู่เซลล์ชนิด Interstitial cell ของลิ้นหัวใจ

ข้าพเจ้า (นาย,นาง,นางสาว).....นามสกุล.....อายุ .....ปี

บัตรประชาชน/ข้าราชการเลขที่ .....

อยู่บ้านเลขที่.....หมู่ที่.....ตำบล .....อำเภอ.....จังหวัด.....

(ในกรณีที่อาสาสมัครมีอายุต่ำกว่า 20 ปีบริบูรณ์) เป็นบิดา/มารดา/ผู้ปกครองของ (ด.ญ. ,ด.ช.).....อายุ .....ปี ได้รับฟังคำอธิบายจาก .....เกี่ยวกับการเป็นอาสาสมัครในโครงการวิจัยการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์สู่ เซลล์ชนิด *Interstitial cell* ของลิ้นหัวใจ และได้รับทราบถึงรายละเอียดของโครงการวิจัยเกี่ยวกับ

- วัตถุประสงค์และระยะเวลาที่ทำการวิจัย

  เพื่อแยก เพาะเลี้ยง ตรวจสอบพิสูจน์คุณสมบัติทางชีววิทยาและชีวเคมีของเซลล์ต้นกำเนิด จากโพลงประสาทฟันมนุษย์เพื่อศึกษาความสามารถในการชักนำการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากโพลงประสาทฟันสู่ valvular interstitial cell ลิ้นหัวใจมนุษย์

- ขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติตัวที่ข้าพเจ้าต้องปฏิบัติ

☐ ยินยอมให้ใช้ฟันที่ถูกถอนแล้ว นำไปใช้ในการแยก เพาะเลี้ยง ตรวจสอบพิสูจน์ คุณสมบัติทางชีววิทยาและชีวเคมีของเซลล์ต้นกำเนิด จากโพลงประสาทฟันมนุษย์

☐ ยินยอมให้ใช้ชิ้นส่วนของลิ้นหัวใจที่ทำการผ่าตัดแล้ว โดยต้องไม่เป็นชิ้นเนื้อที่แพทย์ต้องนำไปตรวจพิสูจน์ทางพยาธิวิทยา และได้รับความยินยอมจากแพทย์ที่ทำการผ่าตัดลิ้นหัวใจของข้าพเจ้า (หรือ บุคคลในปกครอง)

- ผลข้างเคียงหรืออันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมโครงการได้แก่....ไม่มี...และหากเกิดมีอาการ ข้างเคียงขึ้น ข้าพเจ้าจะรายงานให้ผู้วิจัยทราบทันที
- ผู้วิจัยและ/หรือผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยขอให้คำรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเกี่ยวกับข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยเฉพาะในรูปที่เป็นการสรุปการวิจัย โดยไม่ระบุตัวบุคคลผู้เป็นเจ้าของข้อมูล

ข้าพเจ้าได้อ่านและเข้าใจคำอธิบายข้างต้นแล้วจึงได้ลงนามยินยอมเป็นอาสาสมัครของโครงการวิจัยดังกล่าว

ลายมือชื่ออาสาสมัคร.....

(.....)

ลายมือชื่อผู้ปกครอง.....

(.....)

ลายมือชื่อผู้ให้ข้อมูล.....

(.....)

พยาน.....(ไม่ใช่ผู้อธิบาย)

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

หมายเหตุ : 1) **ในกรณีที่อาสาสมัครมีอายุต่ำกว่า 20 ปีบริบูรณ์ และสามารถตัดสินใจเองได้ ให้ลงลายมือชื่อทั้งอาสาสมัคร (เด็ก) และผู้ปกครองด้วย**

2) พยานต้องไม่ใช่ผู้วิจัย หรือผู้ร่วมวิจัย และผู้มีส่วนได้ส่วนเสียกับโครงการวิจัย

3) ผู้ให้ข้อมูล/คำอธิบาย ต้องไม่เป็นแพทย์ที่ทำโครงการวิจัยนี้ด้วยตนเอง เพื่อป้องกันการเข้าร่วมโครงการด้วยความเกรงใจ

4) ในกรณีที่อาสาสมัครไม่สามารถ อ่านหนังสือ/ลงลายมือชื่อได้ ให้ใช้การประทับลายมือแทนดังนี้ :

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในแบบคำยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดี ข้าพเจ้าจึงประทับตรา**ลายนิ้วมือขวา** ของข้าพเจ้าในแบบคำยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลายมือชื่อผู้อธิบาย.....

(.....)

พยาน.....(ไม่ใช่ผู้อธิบาย)

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ประทับลายนิ้วมือขวา

หมายเหตุ: ขอให้ผู้วิจัยระบุรายละเอียดตามความเหมาะสมให้สอดคล้องกับลักษณะโครงการ

ภาคผนวก ค
กิจกรรมตามตัวชี้วัดของโครงการ

ถ่ายทอดผลงานวิจัย/เทคโนโลยีสู่กลุ่มเป้าหมายและได้รับการรับรองการใช้ประโยชน์จากหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

ผู้วิจัยได้นำผลงานวิจัยไปนำเสนอ ในที่ประชุมของหน่วยวิจัยชีวการแพทย์ทางด้านวิทยาศาสตร์ของหัวใจและหลอดเลือด คณะสหเวชศาสตร์ โดยมีนักวิจัย และนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาเข้ารับฟังการบรรยายเผยแพร่ความรู้ และได้ทำการแลกเปลี่ยนเรียนรู้เกี่ยวกับงานวิจัย โดยก่อให้เกิดประโยชน์ในการนำความรู้ไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัย และจัดเตรียมชุดโครงการวิจัยสำหรับขอรับการสนับสนุนทุนวิจัยจากหน่วยงานภายนอก

แบบแจ้งยืนยันการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เรียน อธิการบดี มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตามที่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สราวุธ คำปวน สังกัดมหาวิทยาลัยนเรศวร ได้ดำเนินผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ เรื่องการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์สู่เซลล์ชนิด Interstitial cell ของลิ้นหัวใจ และดำเนินการเสร็จสิ้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2557 นั้น

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการดำเนินงานของหน่วยวิจัยชีวการแพทย์ทางด้านวิทยาศาสตร์ของหัวใจและหลอดเลือด โดยมีรายละเอียดการนำไปใช้ประโยชน์ ดังนี้

- พื้นที่/กลุ่มเป้าหมายในการถ่ายทอด.....
- จำนวนผู้ที่ได้รับประโยชน์ .....15..... คน
- สามารถนำใช้ประโยชน์ในด้านใดบ้าง (โปรดใส่เครื่องหมาย ✓ ในด้านที่ใช้ประโยชน์)
  - การใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะ
    - ☐ ด้านการส่งเสริมประชาธิปไตยภาคประชาชน
    - ☐ ด้านการบริหารจัดการสำหรับหน่วยงานภาครัฐ
    - ☐ ด้านศิลปะและวัฒนธรรม
    - ☐ ด้านวิถีชีวิต
  - การใช้ประโยชน์เชิงนโยบาย
    - ☐ นำไปประกอบเป็นข้อมูลการประกาศใช้กฎหมายหรือกำหนดมาตรการ กฎเกณฑ์ต่าง ๆ โดยองค์กรหรือหน่วยงานภาครัฐและเอกชน
    - ☐ นำไปประกอบเป็นข้อมูลในการจัดทำหรือปรับปรุงนโยบาย ยุทธศาสตร์ แผนงาน โครงการ กิจกรรม โดยองค์กรหรือหน่วยงานภาครัฐและเอกชน
  - การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์
    - ☐ นำไปสู่การพัฒนานวัตกรรม สิ่งประดิษฐ์หรือผลิตภัณฑ์ซึ่งก่อให้เกิดรายได้ หรือนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตหรือการบริการ ทั้งองค์กนหน่วยงานภาครัฐและเอกชน
  - การใช้ประโยชน์ทางอ้อม/ด้านอื่น ๆ (โปรดระบุ) นำความรู้ไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัย และจัดเตรียมชุดโครงการวิจัยสำหรับขอรับการสนับสนุนทุนวิจัยจากหน่วยงานภายนอก

ในการนี้ จึงใคร่ขอขอบคุณในความกรุณาของหน่วยงานท่านเป็นอย่างสูง

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(.....)

ตำแหน่ง.....นักวิจัย.....

หน่วยวิจัยชีวการแพทย์ทางด้านวิทยาศาสตร์ของหัวใจและหลอดเลือด

วันที่.....

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

บทบาทของ Secretory Leukocytes Protease Inhibitor (SLPI) ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

Role of Secretory Leukocytes Protease Inhibitor (SLPI) in myocardial ischemia

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนพ.สราวุธ คำปวน และคณะ

มกราคม 2558

เลขทะเบียน 84

หนังสือยินยอมการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการบนเว็บไซต์ ฐานข้อมูล NU Digital Repository (http://obj.lib.nu.ac.th/media/) สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตามที่ข้าพเจ้า ผศ.ดร.ทนพ.สราวุธ คำปวน (ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์)
ได้ส่ง ผลงานทางวิชาการการรายงานการวิจัย (เรื่อง) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์การชักนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์สู่เซลล์ชนิด Interstitial cell ของลิ้นหัวใจ

ปีที่พิมพ์ 2558

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานทางวิชาการเป็นลิขสิทธิ์ของข้าพเจ้า ผศ.ดร.ทนพ.สราวุธ คำปวน (ผู้วิจัยร่วม) และท่านอื่น ๆ เป็นเจ้าของลิขสิทธิ์ร่วม และเพื่อให้ผลงานทางวิชาการของข้าพเจ้าเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและสาธารณชน จึงอนุญาตให้เผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- ☑ อนุญาตให้เผยแพร่
- ☐ ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ เนื่องจาก.....

.....

.....

ลงชื่อ .....
(ผศ.ดร.ทนพ.สราวุธ คำปวน)
วันที่ 2 พ.ย. 2558

หมายเหตุ ลิขสิทธิ์ใดๆ ที่ปรากฏอยู่ในผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของเจ้าของผลงาน ไม่ใช่ของสำนักหอสมุด